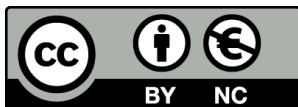


ESTUDI DE L'ALLIBERACIÓ DEL CALCI  
INTRACEL·LULAR EN CARDIOMIÒCITS  
DERIVATS DE IPSC DE PACIENTS AMB  
TAQUICÀRDIA VENTRICULAR POLIMÒRFICA  
CATECOLAMINÈRGICA (CPVT)

**David Carreras Gorgals**



<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/deed.ca>

Aquesta obra està subjecta a una llicència Creative Commons Reconeixement-NoComercial

Esta obra está bajo una licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial licence



TESI DOCTORAL

**Estudi de l'alliberació del calci intracel·lular en cardiomiòcits derivats de iPSC de pacients amb taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT).**

David Carreras Gorgals

2023





Institut  
d'Investigació  
Biomèdica  
de Girona  
Dr. Josep Trueta

TESI DOCTORAL

**Estudi de l'alliberació del calci intracel·lular en cardiomiòcits derivats de iPSC de pacients amb taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT).**

David Carreras Gorgals

2023

Programa de Doctorat en Biologia Molecular, Biomedicina i Salut

Dirigida per:

Dr. Ramon Brugada i Dr. Guillermo Javier Pérez

Tutor:

Dr. Guillermo Javier Pérez

Memòria presentada per optar al títol de doctor per la

Universitat de Girona

1 Annex





Institut  
d'Investigació  
Biomèdica  
de Girona  
Dr. Josep Trueta

El Dr. Ramon Brugada Tarradellas, catedràtic de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona, director del Centre de Genètica Cardiovascular de l'Institut d'Investigació Biomèdica de Girona i cap de cardiologia de l'Hospital Josep Trueta.

El Dr. Guillermo Javier Pérez González, professor agregat de la Facultat de Medicina de la Universitat de Girona i investigador sènior del Centre de Genètica Cardiovascular.

DECLAREM: Que el treball titulat **“Estudi de l’alliberació del calci intracel·lular en cardiomiòcits derivats de iPSC de pacients amb taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT)”** que presenta en **David Carreras Gorgals** per a l’obtenció del títol de doctor ha estat realitzat sota la nostra direcció. I, perquè així consti i tingui el efectes oportuns, signem aquest document.

Girona, 1 de març del 2023

Dr. Ramon Brugada Tarradellas

Dr. Guillermo Javier Pérez González

David Carreras Gorgals



## Agraïments

### AGRAÏMENTS

Per fi ha arribat el moment d'escriure paraules d'agraïment a totes les persones que m'han acompanyat durant aquests anys.

Primer de tot vull donar les gràcies a en Ramon i en Guillermo per donar-me l'oportunitat de formar part del Centre de Genètica Cardiovascular i de permetrem fer la tesi amb vosaltres. Us estic molt agraït per la oportunitat que m'heu donat i espero haver estat a l'altura. Guillermo, vull agrair-te tot el suport que m'has donat i tota la passió que m'has contagiada cap a la ciència. Quan vaig començar no sabia ni que eren les imatges de calci, però en tots aquests anys m'has ensenyat tot el que sé. Has fet que gaudeixi muntant petites canonades, fent els maleïts *journals* que mai funcionen a la primera i m'has ensenyat a entendre la importància del que un fa i a donar-li valor. També no em vull deixar de donar-te les gràcies per les correccions de la tesi, abstracts i per la oportunitat d'anar a tants congressos. Gràcies per tot!

Eli, si a dia d'avui se cultivar una cèl·lula es gràcies a tu i a la teva paciència. Fabi, moltes gràcies pels consells donats tots aquests anys i per tot el coneixement compartit. Moltes gràcies a les dos per tot el que m'heu ensenyat!

Companys del CGC us vull agrair a tots tant el bons moments com els dolents que hem viscut. De tots aquests anys m'emporto un bon record tots vosaltres: Marta Vallverdú, Mireia, Yajaira, Adrià Pérez, Núria, Ferran, Laura, Mónica Corona, Marcel Tarragó, Alexandra, Marina, Marta Puigmulé, Imma, Mel·lina, Anna Fernández, Eli Canals, Anna Iglesias, Mónica Coll, Marcel Vergés, Sara, Èric, Adrià Simón i Bernat. Moltes gràcies per tot!

Rebecca, vull donar-te les gràcies per tots els moments compartits tant a cultius (que han sigut molts) com a la poiata. Tot i ser bastant diferents de caràcter crec que al final hem fet bon equip i tot! I una de les coses per la quals sempre t'estaré molt agraït és per haver compartit la custòdia de les cèl·lules els caps de setmana i per cuidar-les tant bé! Sense la custòdia compartida no hagués pogut acabar la tesi.

Bet i Sara, sort n'he tingut de vosaltres! Si no haguéssiu muntat "Suport a la Recerca 2" qui m'hagués donat tants consells? A part de compartir el vostre coneixement



## Agraïments

inacabable amb mi, hem compartit molts bons moments al laboratori. Sense vosaltres la gran quantitat d'hores a la sala cultius no haguessin estat tant divertides.

Irene, Marina i Marga gràcies a vosaltres l'època universitari ha sigut una de les millors èpoques de la meva vida. Gràcies pels moments compartits al bar, a la sala dels microones, i també fora de la uni. Espero que seguim compartint moments molts anys més!

Alba, Gerard, Jana, Maria, Oleguer Rubén, Xavi i Luc gent de Llers! Que us he de dir que ja no us hagi dit? Part del mèrit que hagi arribat a poder acabar la tesi també és vostre. En els moments més baixos en que em plantejava si seguir o no us he tingut donant-me suport. M'heu tret somriures i les preocupacions del cap quan ha fet falta. Us agraeixo molt que estigueu a la meva vida i espero que molts anys podem seguir compartint els nostres camins!

Albert, moltes gràcies per tot el suport que m'has donat. Se que aquests anys han estat molt complicats entre els meus canvis d'humor, les hores que he dedicat a la tesi i els cap de setmanes a cultius. Però sempre has estat allà donant-me el suport que he necessitat. No sé com agrair-te tot el que has fet per mi, tinc molta sort de tenir-te al meu costat!

Mama, qui t'hagués dit que després de tot el que hem viscut el teu nen acabaria presentat la tesi. Ho hem patit els dos, i ha costat. Hem passat molts mals moments però ens hem donat suport sempre. Som dos i sempre hem remat com un. No puc deixar d'agrair-te com m'has cuidat i tota la quantitat de tapers que m'has fet durant aquest anys (que no han sigut pocs!), no hi ha paraules al mon per poder-te agrair tota aquesta feina titànica. Moltes gràcies per estar amb mi i ajudar-me, no podria tenir una mare millor!

Volia deixar el meu agraïment més especial pel final. Papa, ja fa més de 9 anys que te'n vas anar. Tot i no tenir-te al meu cantó t'he tingut present tots i cada un dels dies des de que el càncer se't va emportar. El que més il·lusió em faria és poder compartir aquest moment amb tu però per desgracia no pot ser... Se que el dia de la defensa estaràs amb mi, fent-me costat des d'allà on siguis i espero que et sentis orgullós de mi.

## **Agraïments**

També dono les gracies a les institucions que han fet possible aquesta tesi: a l'Agència de Gestió D'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) beneficiaria del Fons Social Europeu, amb la Beca Fi per a personal investigador i l'Obra Social La Caixa.



## **PUBLICACIONES CIENTÍFIQUES DERIVADES DE LA TESI**

**David Carreras;** Rebecca Martinez-Moreno; Elisabet Selga; Ramon Brugada; Fabiana S. Scornik; Guillermo J. Pérez.  $\beta$ -Adrenergic Pathway is Enhanced by Hormone-Induced Maturation of Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (iPS-CM). *Biophysical Journal*. **3**. 383a (2019).

**David Carreras;** Rebecca Martinez-Moreno; Elisabet Selga; Ramon Brugada; Fabiana S. Scornik; Guillermo J. Pérez. CPVT-Associated Mutation p.G357S-RYR2 Promotes a Gain of Function in Patient-Specific Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes (iPS-CM). *Biophysical Journal*. **3**. 225a (2020).



## Llistat d'abreviatures

### LLISTAT D'ABREVIATURES

<b>A</b>	Absorbància
<b>B</b>	Benigne
<b>BCA</b>	Assaig del àcid bicinconínic
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina
<b>BWA-MEM</b>	<i>Burrows-Wheeler Alignment- Maximal Exact Match</i>
<b>CALM1</b>	Calmodulina 1
<b>CALM2</b>	Calmodulina 2
<b>CALM3</b>	Calmodulina 3
<b>CaM</b>	Calmodulina
<b>CAMKII</b>	Quinasa dependent de calmodulina II
<b>cAMP</b>	AMP cíclic
<b>CASQ2</b>	Calseqüestrina 2
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>CICR</b>	<i>Calcium induced calcium release</i>
<b>CPVT</b>	Taquicàrdia Ventricular Polimòrfica Catecolaminèrgica
<b>DAD</b>	Post-despolaritzacions tardanes
<b>DAI</b>	Desfibril·lador Automàtic Implantable
<b>DAPI</b>	4',6-Diamidino-2-Phenylindole
<b>dbNSFP</b>	<i>Database for nonsynonymous SNPs' functional predictions</i>
<b>dbSNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism Database</i>
<b>Dex</b>	Dexametasona
<b><math>\Delta F/F_0</math></b>	Amplitud del transitori
<b>DMSO</b>	Sulfòxid de dimetil
<b>DPBS</b>	Tampó fosfat salí de Dulbecco
<b>EB</b>	Cossos embrionaris
<b>EBNA1</b>	<i>Epstein-Barr Nuclear Antigen 1</i>
<b>E-C</b>	Excitació-contracció
<b>EDTA</b>	Àcid etilendiaminotetraacètic
<b>ESC</b>	Cèl·lules mare embrionàries
<b>FBS</b>	Sèrum fetal boví
<b>FSC</b>	<i>Forward scatter</i>
<b>GATK</b>	<i>Genome Analysis Tool Kit</i>
<b>HRP</b>	<i>Horse radish peroxidase</i>
<b><math>I_{Ca,L}</math></b>	Corrent de $Ca^{2+}$ del canal de tipus L
<b><math>I_f</math></b>	<i>Funny current</i>
<b><math>I_{K1}</math></b>	Corrent rectificadora de potassi
<b><math>I_{Kr}</math></b>	Corrent de potassi ràpida
<b><math>I_{Ks}</math></b>	Corrent de potassi lenta
<b><math>I_{Kur}</math></b>	Corrent de potassi ultra ràpida
<b><math>I_{Na}</math></b>	Corrent de sodi
<b>INDELS</b>	Inserció o deleció

## Llistat d'abreviatures

<b>iPSC</b>	Cèl·lules mare pluripotents induïdes
<b>iPSC-CM</b>	Cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes
<b>ISO 100 nM</b>	Isoproterenol a 100 nM
<b>I<sub>to</sub></b>	Corrent sortint transitòria de potassi
<b>KOSR</b>	<i>Knock-Out Serum Replacement</i>
<b>LTCC</b>	Canals de Ca <sup>2+</sup> dependents de voltatge de tipus L
<b>MSC</b>	Mort sobrada cardíaca
<b>NAV</b>	Nòdul auriculoventricular
<b>NCX</b>	Intercanviador Na <sup>+</sup> -Ca <sup>2+</sup>
<b>NSA</b>	Nòdul sinoauricular
<b>PAC</b>	Potencial d'acció cardíac
<b>PBS-</b>	Tampó Fosfat Salí
<b>PBST</b>	PBS amb 0.1% Tween-20
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerassa
<b>PKA</b>	Proteïna quinasa A
<b>PLN</b>	Fosfolamban
<b>P<sub>o</sub></b>	Probabilitat d'obertura
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>R<sup>2</sup></b>	Coeficient de determinació
<b>RIN</b>	Nombre d'integritat del RNA
<b>ROCKi</b>	Inhibidor de la quinasa ROCK1
<b>ROI</b>	Regió d'interès
<b>RPE</b>	Reflex pressor de l'exercici
<b>RYRs</b>	Receptors de rianodina
<b>RYR2</b>	Receptor de Rianodina de tipus 2
<b>S</b>	Serines
<b>SDS</b>	Sodi dodecil sulfat
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
<b>snpEff</b>	<i>SNP Effect</i>
<b>snpSift</b>	<i>SNP Sorting Intolerant From tolerant</i>
<b>SNV</b>	Variants d'un sol nucleòtid
<b>SOICR</b>	<i>Store Overload induced calcium release</i>
<b>SSC</b>	<i>Side Scatter</i>
<b>SUDEP</b>	Mort sobtada en pacients amb epilèpsia
<b>T</b>	Treonina
<b>T3</b>	3,3',5-Triiodo-L-tironina
<b>TBS</b>	Tampó Tris Salí
<b>TECRL</b>	trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like
<b>TRDN</b>	Triadina
<b>TVB</b>	Taquicàrdies ventriculars bidireccionals
<b>TVP</b>	Taquicàrdies ventriculars polimòrfiques
<b>VSI</b>	Variant de significat incert
<b>WT</b>	<i>Wild Type</i>

# Índex de contingut

## ÍNDIX DE CONTINGUT

AGRAÏMENTS .....	i
PUBLICACIONS CIENTÍFIQUES DERIVADES DE LA TESI .....	v
LLISTAT D'ABREVIATURES.....	vii
ÍNDIX DE CONTINGUT .....	ix
ÍNDIX DE FIGURES .....	xiii
ÍNDIX DE TAULES.....	xvii
RESUM .....	1
RESUMEN.....	5
SUMMARY .....	9
I. INTRODUCCIÓ.....	13
1. La mort sobtada al sud de l'Illa de Gran Canària.....	15
2. Mort sobtada cardíaca .....	17
2.1. Activitat elèctrica del cor .....	18
2.2. Acoblament Excitació-Contracció .....	20
2.2.1. Alliberació del calci intracel·lular .....	20
2.2.2. Recaptació del calci intracel·lular .....	23
2.2.3. Finalització del CICR .....	24
2.2.4. <i>Store Overload Induced Calcium Release</i> (SOICR) .....	24
2.2.5. Estimulació $\beta$ -adrenèrgica dels cardiomiòcits .....	25
3. Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT) .....	28
3.1. Característiques clíniques i diagnòsics.....	29
3.2. Genètica de la CPVT .....	30
3.3. Tractament de la CPVT .....	32
3.4. Expressivitat variable i penetrància incompleta .....	33
3.5. Mecanisme de generació d'arrítmies en la CPVT .....	34
4. El receptor de rianodina de tipus 2 .....	37
4.1. Propietats biofísiques del RYR2.....	37
4.2. Estructura del gen i la proteïna RYR2.....	38
4.2.1. Canvis conformacionals que indueixen l'obertura del RYR2 .....	41
4.3. Activació del RYR2 per lligands endògens i exògens.....	42
4.3.1. Lligands endògens.....	42



## Índex de contingut

4.3.2.	Lligands exògens .....	44
4.4.	RYR2 i el seu complex macromolecular .....	44
4.4.1.	Interacció calseqüestrina 2, junctina i triadina.....	45
4.4.2.	Calmodulina .....	47
4.4.3.	Proteïnes d'unió FK506: FKBP12 i FKBP12.6.....	47
4.4.4.	PKA i CAMKIIA .....	48
4.5.	Efecte funcional de les mutacions en RYR2 .....	51
4.5.1.	Efecte de les mutacions als dominis N-terminal i regió Central.....	52
4.5.2.	Efecte de les mutacions en la regió C-terminal .....	53
5.	Models per l'estudi de la CPVT.....	54
5.1.	Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC) .....	55
5.2.	Cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC-CM). 56	
5.3.	La immaduresa dels iPSC-CM .....	57
5.4.	Maduració dels iPSC-CM .....	59
5.5.	Variabilitat en la diferenciació de les iPSC a iPSC-CM.....	60
5.6.	iPSC-CM en l'estudi de mutacions en el RYR2 .....	62
II.	Plantejament de la recerca .....	65
III.	Hipòtesis i Objectius .....	71
V.	MATERIAL I MÈTODES.....	75
1.	Selecció dels individus .....	77
1.1.	Selecció dels individus per l'estudi.....	77
1.2.	Obtenció de les biòpsies de pell.....	78
1.3.	Processament de les biòpsies de pell per a l'expansió dels fibroblasts.....	78
2.	Reprogramació dels fibroblasts a cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC) .....	80
2.1.	Reprogramació dels fibroblasts per factors episomals a iPSC .....	80
2.2.	Caracterització de les línies iPSC generades .....	80
2.2.1.	Determinació de la presència de transgens de reprogramació i expressió de factors de transcripció de pluripotència endògens.....	80
2.2.2.	Cariotip.....	81
2.2.3.	Tinció de la fosfatasa alcalina .....	81
2.2.4.	Immunofluorescències dels marcadors de pluripotència .....	82
2.2.5.	Formació dels <i>Embryoid bodies</i> i immunohistouímica de marcadors de endoderm, mesoderm i ectoderm .....	82
2.3.	Seqüenciació de l'exó 13 del gen <i>RYR2</i> .....	83

## Índex de contingut

2.3.1.	Extracció de DNA genòmic de les iPSC .....	83
2.3.2.	Amplificació, purificació i seqüenciació per Sanger .....	84
3.	Estudi molecular i funcional del canal RYR2.....	86
3.1.	Cultius de iPSC.....	86
3.2.	Diferenciació de les iPSC a iPSC-CM.....	87
3.3.	Anàlisis d'expressió de marcadors de cardiomiòcits per immunofluorescència.....	90
3.4.	Anàlisis d'expressió per Western Blot.....	91
3.4.1.	Extracció i quantificació de les proteïnes dels iPSC-CM .....	91
3.4.2.	Electroforesi desnaturalitzant en SDS-acrilamida i Western Blot .....	92
3.5.	Anàlisis d'expressió per PCR quantitativa (qPCR) .....	94
3.5.1.	Extracció de RNA, quantificació i integritat .....	94
3.5.2.	Retrotranscripció de les mostres de RNA a DNA complementari (cDNA) ...96	
3.5.3.	qPCR .....	97
3.6.	Preparació del iPSC-CM per citometria de flux.....	100
3.7.	Caracterització funcional del canal RYR2 en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic .....	102
3.7.1.	Corbes concentració-resposta de cafeïna en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic .....	103
3.7.2.	Transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per un pols de 10 mM de cafeïna en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic.....	103
3.7.3.	Transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic.....	104
4.	Seqüenciació del genoma dels individus.....	105
5.	Anàlisi estadística .....	107
VI.	RESULTATS.....	109
1.	Caracterització de les línies iPSC generades.....	111
1.1.	Determinació de la presència de la mutació <i>RYR2_c.G1069A</i> a les línies iPSC ....113	
2.	Caracterització dels iPSC-CM mitjançant marcadors de pluripotència i cardíacs ....114	
2.1.	El protocol de diferenciació reprimeix l'expressió de factors de transcripció de pluripotència i indueix l'expressió dels gens codificants per proteïnes citoesquelètiques cardíques.....	114

## Índex de contingut

2.2.	Els iPSC-CM presenten marcatge organitzat de troponina T i $\alpha$ -actinina per immunofluorescència.....	116
2.3.	Eficiència de diferenciació a iPSC-CM .....	117
2.4.	Els nivells de troponina T i $\alpha$ -actinina no difereixen entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S i els iPSC-CM de l'individu control sa....	120
2.5.	Els nivells de troponina T i $\alpha$ -actinina poden ser utilitzats com a normalitzadors de l'eficiència de diferenciació de les iPSC a iPSC-CM.....	122
3.	El tractament amb T3+Dex indueix un augment de l'inotropisme en resposta a l'estimulació $\beta$ -adrenèrgica .....	123
4.	Estudis de l'acoblament E-C en iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S i del control sa .....	127
5.	Els transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per cafeïna 10 mM mostren un guany de funció en els iPSC-CM dels individus RYR2_p.G357S.....	134
6.	La mutació RYR2_p.G357S indueix un guany de funció sense necessitat de l'activació de la via $\beta$ -adrenèrgica .....	140
7.	La mutació RYR2_p.G357S no indueix canvis en la quantitat de proteïna de RYR2 ....	147
8.	Estudi del patrimoni genètic dels individus mitjançant la seqüenciació del genoma sencer.....	149
8.1.	Variants trobades a l'individu CPVT-51.....	149
8.2.	Variants comunes dels individus CPVT-52 i CPVT-53.....	150
VII.	DISCUSSIÓ.....	153
1.	La maduració dels iPSC-CM permet obtenir un model fisiològicament rellevant per a l'estudi de l'efecte de la mutació RYR2_p.G357S en els iPSC-CM individus específics.....	155
2.	El fenotip donat per la mutació RYR2_p.G357S altera la funcionalitat dels RYR2, alterant l'homeòstasi del $Ca^{2+}$ intracel·lular únicament quan s'indueix l'activació de la via $\beta$ -adrenèrgica en situacions d'estrès, podent ser modulable pel nombre d'al·lels mutats.....	157
3.	El guany de funció a RYR2 causat per la mutació RYR2_p.G357S es veu mitigat per la reducció de la quantitat de proteïna present en els iPSC-CM.....	163
4.	El patrimoni genètic dels individus modula la severitat del fenotip de la mutació RYR2_p.G357S.....	165
5.	Discussió global dels resultats obtinguts.....	169
VIII.	CONCLUSIONS .....	171
IX.	BIBLIOGRAFIA .....	175

### ÍNDIX DE FIGURES

Figura 1. Pedigrí de la Gran Família de l'Illa de Gran Canària. Es mostren els 2000 individus vius que comparteixen un avantpassat comú. ....	16
Figura 2. Representació esquemàtica de l'anatomia del cor humà.....	18
Figura 3. Potencial d'acció cardíac ventricular.....	20
Figura 4. Acoblament excitació-contracció.....	22
Figura 5. Generació de l'activitat SOICR.....	25
Figura 6. Via $\beta$ -adrenèrgica.....	28
Figura 7. Electrocardiograma d'una prova d'esforç d'un pacient amb CPVT. ....	30
Figura 8. Mecanisme de generació d'arrítmies ventriculars per a mutacions amb guany i pèrdua de funció en el RYR2 associades a la CPVT. ....	36
Figura 9. Estructura del RYR2. ....	39
Figura 10. Estructura d'un monòmer de RYR2. ....	41
Figura 11. Canvis conformacionals del RYR2 per l'obertura. ....	42
Figura 12. Llocs d'unió del $\text{Ca}^{2+}$ al RYR2.....	43
Figura 13. Complex macromolecular del RYR2.. ....	45
Figura 14. Comparació de l'organització estructural entre un cardiomiòcit immadur (iPSC-CM, part superior) i un cardiomiòcit madur (part inferior). ....	58
Figura 15. Protocol de diferenciació optimitzat per a la diferenciació d'iPSC a iPSC-CM. ....	88
Figura 16. Xip del Kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano.....	96
Figura 17. Representació esquemàtica del funcionament de les sondes TaqMan per a la mesura d'expressió.....	98
Figura 18. Paràmetres mesurats per a cada un dels transitoris de $\text{Ca}^{2+}$ . ....	104
Figura 19. Cariotip (A) i tinció de la fosfatasa alcalina (B) de la línia iPSC de l'individu CPVT-51. ....	112
Figura 20. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-51.....	112
Figura 21. Immunohistoquímica de la diferenciació In vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-51. ....	113

## Índex de figures

Figura 22. Seqüenciació de l'exó 13 de <i>RYR2</i> a les mostres de sang (esquerra) i les sis línies iPSC (dreta) dels individus portadors de la mutació <i>RYR2_c.G1069A</i> i de l'individu control sa. ....	114
Figura 23. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren una repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte a les iPSC. ....	115
Figura 24. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte a les iPSC. ....	116
Figura 25. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	117
Figura 26. Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC de l'individu control sa GPG1 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules. ....	118
Figura 27. L'eficiència de diferenciació és igual per les línies iPSC dels tres individus. ....	119
Figura 28. Els iPSC-CM de l'individu control sa i dels individus portadors de la mutació <i>RYR2_p.G357S</i> presenten nivells semblants de troponina T. ....	121
Figura 29. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 presenta nivells superiors de $\alpha$ -actinina respecte l'individu CPVT-51. ....	122
Figura 30. Els nivells de troponina T i de $\alpha$ -actinina presenten una alta correlació. ...	123
Figura 31. Els iPSC-CM de l'individu control sa no tractats mostren un lleuger augment de la sensibilitat a cafeïna en presència d'ISO 100 nM. ....	125
Figura 32. El tractament de T3+Dex indueix un augment de l'inotropisme als iPSC-CM en resposta a l'estimulació $\beta$ -adrenèrgica. ....	126
Figura 33. Els transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica a nivell basal mostren un patró línia específic. ....	128
Figura 34. L'aplicació d'ISO 100 nM no indueix l'aparició d'un patró específic entre els iPSC-CM dels individus portadors del mateix nombre d'al·lels mutats en els transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp. ....	129
Figura 35. Traços de iPSC-CM representatius pels experiments de transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals (esquerra) i en presència d'ISO 100 nM (dreta). ....	131
Figura 36. La mutació <i>RYR2_p.G357S</i> no afecta als nivells de <i>CACNA1C</i> ni de <i>FKBP1B</i> . ....	132

## Índex de figures

Figura 37. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 presenten nivells superiors de <i>PLN</i> que els iPSC-CM de l'individu CPVT-51. ....	133
Figura 38. Els transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals no mostren un patró associat al nombre d'al·lels mutats. ....	135
Figura 39. L'aplicació d'ISO 100 nM no desemmascara un comportament comú entre els transitoris induïts per cafeïna 10 mM en els iPSC-CM d'individus amb el mateix nombre d'al·lels portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	136
Figura 40. Traços d'iPSC-CM representatius pels experiments d'inducció de transitoris de $Ca^{2+}$ per cafeïna 10 mM en condicions basals (esquerra) i en presència d'ISO 100 nM (dreta). ....	139
Figura 41. Els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S mostren un augment de la sensibilitat a cafeïna respecte als iPSC-CM de l'individu control sa en condicions basals. ....	141
Figura 42. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren una disminució de la sensibilitat a cafeïna respecte als iPSC-CM dels altres individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S i de l'individu control sa. ....	142
Figura 43. Traços representatius de la mitjana de tots els iPSC-CM analitzats en els experiments de concentració-resposta de cafeïna en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM per a tots els individus. ....	144
Figura 44. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren nivells inferiors d' <i>ADRB2</i> respecte als iPSC-CM dels individus CPVT-51 i CPVT-54, però no veu modificats els seus nivells d' <i>ADRB1</i> . ....	145
Figura 45. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren nivells superiors de <i>CAMK2A</i> respecte als iPSC-CM de l'individu CPVT-51. ....	146
Figura 46. Els nivells d'expressió de <i>RYR2</i> són iguals tant en els iPSC-CM de l'individu control sa com en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	147
Figura 47. Els nivells de <i>RYR2</i> no es veuen alterats per la mutació RYR2_p.G357S. ....	148
Figura 48. Localització de les mutacions en el domini N-terminal de les quals s'ha estudiat l'efecte en l'estabilitat de la proteïna. ....	164



### ÍNDIX DE TAULES

Taula 1. Mutacions que causen guany o pèrdua de funció en el RYR2 classificades per la seva localització per Hot spots. ....	52
Taula 2. Classificació de mutacions d'un sol canvi de nucleòtid estudiades en iPSC-CM segons si es troben dins del Hot Spots o no al llarg del RYR2. ....	62
Taula 3. Descripció dels individus inclosos dins l'estudi. ....	78
Taula 4. Composició del medi de cultiu de fibroblasts. ....	78
Taula 5. Encebadors utilitzats per a la determinació de la presència de vectors episomals de reprogramació i l'expressió dels factors de transcripció de pluripotència. ....	81
Taula 6. Components de la mix de PCR. ....	84
Taula 7. Programa de PCR utilitzat. ....	84
Taula 8. Components de la reacció del <i>BigDye</i> . ....	85
Taula 9. Programa utilitzat per la reacció de <i>BigDye</i> . ....	85
Taula 10. Composició del medi de diferenciació. ....	88
Taula 11. Composició del medi per a la selecció metabòlica. ....	88
Taula 12. Composició del medi de disgregació. ....	89
Taula 13. Composició del medi de maduració els iPSC-CM. ....	90
Taula 14. Composició de la solució PFS. ....	90
Taula 15. Anticossos utilitzats per a les immunofluorescències dels marcadors de cardiomiòcits. ....	90
Taula 16. Anticossos secundaris utilitzats per a les immunofluorescències dels marcadors de cardiomiòcits. ....	91
Taula 17. Composició del tampó de lisis per a l'extracció de proteïna. ....	91
Taula 18. Composició de tots els tampons utilitzats pel western blot. ....	93
Taula 19. Anticossos utilitzats en els experiments de western blot. ....	93
Taula 20. Composició de la solució per a la preparació i incubació del anticòs primari. ....	93
Taula 21. Anticossos secundaris utilitzats per a western blot. ....	94
Taula 22. Components de la reacció de qPCR. ....	99
Taula 23. Sondes TaqMan utilitzades per a la mesura d'expressió de cada un dels gens d'interès. ....	99
Taula 24. Programa utilitzat per a la reacció de qPCR. ....	99



## Índex de taules

Taula 25. Composició de la solució de permeabilització i bloqueig.....	100
Taula 26. Anticossos utilitzats per a la citometria dels iPSC-CM.....	100
Taula 27. Anticossos secundaris utilitats per citometria de flux dels iPSC-CM.....	101
Taula 28. Composició de la solució fisiològica NK.....	102
Taula 29. Organització dels criteris de les guies ACMG/AMP per a la classificació de variants genètiques. ....	107
Taula 30. Taula resum de la caracterització de les línies iPSC.....	111
Taula 31. La comparació dels ajustaments de les corbes de Hill entre condicions basal i ISO 100 nM mostra diferències significatives majors en els iPSC-CM tractats amb T3+Dex. ....	126
Taula 32. La modificació en els paràmetres mesurats dels transitoris induïts per estimulació elèctrica no té un comportament associat al nombre d'al·lels amb la mutació RYR2_p.G357S. ....	130
Taula 33. La modificació en els paràmetres mesurats dels transitoris induïts per un pols de cafeïna 10 mM no tenen un comportament associat al nombre d'al·lels amb la mutació RYR2_p.G357S. ....	138
Taula 34. Comparació dels valors de $K_d$ de les diferents corbes concentració-resposta dels iPSC-CM de l'individu control sa i dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	141
Taula 35. Comparació de $K_d$ de les corbes concentració-resposta en condicions ISO 100 nM dels iPSC-CM del control sa i dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	143
Taula 36. Comparació de les $K_d$ entre condició basal i en presència d'ISO 100 nM per als iPSC-CM del diferents individus.....	143
Taula 37. Variants úniques identificades en el genoma de l'individu CPVT-51. ....	150
Taula 38. Variants comunes entre l'individu CPVT-52 i l'individu CPVT-53. ....	151

### RESUM

La taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT) és una malaltia hereditària que es caracteritza per l'aparició d'arrítmies ventriculars en situacions d'estrès físic o emocional que causen síncope, arrítmies cardíaques i mort sobtada cardíaca (MSC) en individus joves amb el cor estructuralment normal. Més del 50% dels casos diagnosticats de CPVT es troben associats a mutacions en el gen del receptor de rianodina de tipus 2 (*RYR2*). Aquestes mutacions presenten penetrància incompleta i expressivitat variable, suggerint que el patrimoni genètic dels individus podria jugar un paper important en la modulació del fenotip de la malaltia.

Entre els anys 1994-2007 al sud de l'Illa de Gran Canària es van identificar 11 casos de MSC en situacions d'estrès emocional o físic en individus joves. Aquests individus formaven part de quatre famílies aparentment no relacionades, però es va sospitar que els casos poguessin estar relacionats. Un gran estudi genealògic va permetre connectar les quatre famílies dins d'un arbre genealògic de més de 2000 membres amb un avantpassat comú nascut el 1749. Els anàlisis genètics van revelar que la mutació *RYR2\_c.G1069A* (*RYR2\_p.G357S*) podria ser la causant dels casos de CPVT que havien causat la MSC als individus portadors. Inicialment, es van identificar 179 portadors vius d'aquesta mutació i 36 subjectes morts. D'entre els individus morts, 6 eren genotip positius i els altres havien mort en circumstàncies documentades altament suggestives de CPVT. En estudis amb cèl·lules HEK-293T es va determinar que la mutació generava un guany de funció en situacions d'estimulació de la via  $\beta$ -adrenèrgica, la qual cosa explicaria els casos de MSC en estrès emocional i/o físic dels individus joves d'aquesta gran família. Estudis posteriors, van proposar que la variabilitat en la penetrància i expressivitat del fenotip en la família podria ser explicada per una disminució de la quantitat de proteïna del *RYR2* provocada per la mutació.

La possibilitat de generar cardiomiòcits a partir de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC-CM) dels individus portadors de la mutació *RYR2\_p.G357S* obria la possibilitat d'estudiar com la mutació alteraria la funció dels canals *RYR2* nadius en cardiomiòcits específics del pacient, a diferència dels canals recombinants, i com es podria relacionar el patrimoni genètic de l'individu amb el fenotip cel·lular observat. Amb aquesta base

## Resum

ens vàrem proposar investigar els mecanismes cel·lulars fonamentals de la relació genotip-fenotip associats a la mutació, partint de la hipòtesi central per aquesta tesi de què **el guany de funció associat a la mutació RYR2\_p.G357S és dependent del nombre d'al·lels mutats i del patrimoni genètic dels individus donants.**

Partint d'aquesta hipòtesi central vàrem estudiar l'efecte de la mutació sobre la funció del RYR2 en iPSC-CM obtinguts de biòpsies de pell de cinc individus donants. També vàrem seqüenciar el genoma complet dels individus. Dos dels individus (CPVT-53 i CPVT-54) presentaven la mutació RYR2\_p.G357S en homozigosi, mentre que els altres tres la presentaven en heterozigosi (CPVT-51, CPVT-52 i CPVT-55). L'individu CPVT-51 (va patir un episodi de presíncope a 19 anys i una MSC recuperada a 21 anys) i l'individu CPVT-55 (no se li coneixia simptomatologia) eren germans. L'individu CPVT-52 (heterozigot, va patir un síncope a 39 anys) i l'individu CPVT-53 (homozigot, va patir un síncope a 8 anys) tenien un parentesc de segon grau ja que eren primera i tercera generació, respectivament, del mateix nucli familiar. L'individu CPVT-54, no tenia cap parentesc amb els individus anteriors, i havia patit dos episodis de síncope, el primer a 8 anys. Tots els individus seleccionats es trobaven sota tractament  $\beta$ -bloquejants excepte l'individu CPVT-52 que el va abandonar. Tots els individus simptomàtics (CPVT-51, CPVT-52, CPVT-53, i CPVT-54) portaven un desfibril·lador automàtic implantat mentre que l'individu CPVT-55 seguia recomanacions d'estil de vida.

Per estudiar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S sobre la dinàmica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, primer vam analitzar els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp dels iPSC-CM derivats de cada individu. En aquests experiments no va ser possible determinar canvis en l'acoblament excitació-contracció. En canvi, els transitoris induïts per estimulació farmacològica directa, utilitzant cafeïna 10 mM, van mostrar un augment de funció generalitzat del RYR2 en totes les línies cel·lulars portadores de la mutació respecte el control sa. Aquest guany de funció es va observar tant en condicions basals com d'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica amb isoproterenol (ISO) 100 nM. Tot i això, no es va distingir un patró associat al nombre d'al·lels mutats.

Seguidament, vàrem realitzar experiments de concentració-resposta de cafeïna i vàrem ajustar la funció de Hill als valors experimentals. Aquests experiments van mostrar que, en condicions basals, totes les línies portadores de la mutació RYR2\_p.G357S

## Resum

presentaven una sensibilitat a la cafeïna major que els iPSC-CM del control sa. Tot i això, els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-53 presentaven un guany de funció encara major que les altres línies portadores. Sorprenentment, l'activació  $\beta$ -adrenèrgica no només no va produir un major augment de la funció en iPSC-CM portadors de la mutació sinó que en dues d'aquestes línies la va disminuir. A diferència dels iPSC-CM del control, la presència d'ISO 100 nM no va provocar un canvi significatiu de la resposta a cafeïna en els iPSC-CM dels individus heterozigots CPVT-51 i CPVT-55, ni en els de l'individu homozigot CPVT-54. Més encara, els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-53 i del heterozigot CPVT-52 van mostrar una caiguda en la sensibilitat a la cafeïna en presència d'ISO 100 nM. La sensibilitat a cafeïna dels iPSC-CM de l'individu CPVT-53 va disminuir fins al nivell dels iPSC-CM dels individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55. En canvi, la sensibilitat a la cafeïna dels iPSC-CM de l'individu CPVT-52 va disminuir fins a quasi el nivell de sensibilitat dels iPSC-CM de l'individu control sa en condicions basals. Aquestes respostes anòmales a la activació  $\beta$ -adrenèrgica per part dels iPSC-CM portadors de la mutació RYR2\_p.G357S suggereixen un grau de disfuncionalitat del canal que podria ser a la base de les arrítmies letals de la malaltia.

Tot i que els iPSC-CM dels individus CPVT-51 i CPVT-55 (germans heterozigots) no van mostrar grans diferències funcionals, més enllà d'una major resposta en els transitoris induïts per cafeïna 10 mM dels iPSC-CM de l'individu CPVT-51, als informes clínics es va registrar una MSC recuperada per part de l'individu CPVT-51, mentre que l'individu CPVT-55 era asimptomàtic. L'estudi de les variants úniques en el genoma de l'individu CPVT-51 va suggerir que la severitat del seu fenotip podria explicar-se per l'efecte modulador de les variants de significat incert *SCN11A\_c.A5366G* (*Nav1.9\_p.H1789R*) i *TTN\_c.G51662A* (*TTN\_p.R17221H*).

El grau de parentesc entre els individus CPVT-52 i CPVT-53 suggeriria la presència d'un factor genètic que actuaria com a protector envers el substrat proarrítmic. L'anàlisi dels genomes dels individus CPVT-52 i CPVT-53 no ens van permetre determinar si alguna de les variants compartides podria ser la responsable de la disminució de la funció observada en els cardiomiòcits corresponents en presència d'ISO 100 nM.

La mutació RYR2\_p.G357S mostra una baixa penetrància dins la família, aquest fet s'havia associat a la desestabilització del domini N-terminal del RYR2 que produïa la

## Resum

disminució de la quantitat de proteïna observada en el model cel·lular HEK-293T. Segons això, la desestabilització del domini N-terminal produiria un guany de funció i una pèrdua de funció a causa de la reducció del nombre de canals de RYR2. En contraposició al model heteròleg, el nostre model natiu de cardiomiòcits específics de pacients ens va permetre determinar que la quantitat de proteïna RYR2 no es veia afectada per la mutació.

Tots els resultats en conjunt suggereixen que el guany de funció causat per la mutació RYR2\_p.G357S en condicions basals i la seva resposta anòmala a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica és el substrat arritmogènic necessari per què es formin les arrítmies malignes. La baixa penetrància i expressivitat de la mutació en la gran família de l'illa de Gran Canària no és donada per la degradació de RYR2. Sinó que variants individuals, com les trobades en aquest estudi, podrien augmentar o disminuir la severitat del fenotip dels individus portadors de la mutació.

### RESUMEN

La taquicardia ventricular polimórfica catecolaminérgica (CPVT) es una enfermedad hereditaria que se caracteriza por la aparición de arritmias ventriculares en situaciones de estrés físico o emocional que causan síncope, arritmias cardíacas y muerte súbita cardíaca (MSC) en individuos jóvenes con el corazón estructuralmente normal. Más del 50% de los casos diagnosticados de CPVT se encuentran asociados a mutaciones en el gen del receptor de rianodina de tipo 2 (*RYR2*). Estas presentan penetrancia incompleta y expresividad variable, sugiriendo que el patrimonio genético de los individuos podría jugar un papel importante en la modulación del fenotipo de la enfermedad.

Entre los años 1994-2007 en el sur de la Isla de Gran Canaria se identificaron 11 casos de MSC en situaciones de estrés emocional o físico en individuos jóvenes. Estos individuos formaban parte de cuatro familias aparentemente no relacionadas, pero se sospechó que los casos pudieran estar relacionados. Un gran estudio genealógico permitió conectar a las cuatro familias dentro de un árbol genealógico de más de 2000 miembros con un antepasado común nacido el 1749. El análisis genético reveló que la mutación *RYR2\_c.G1069A* (*RYR2\_p.G357S*) podría ser la causante de los casos de CPVT que causaron la MSC a los individuos portadores. Se identificaron inicialmente 179 portadores vivos de esta mutación y 36 sujetos muertos. Entre los sujetos muertos 6 eran genotipo positivo y los demás habían muerto en circunstancias documentadas altamente sugestivas de CPVT. En estudios con células HEK-293T se determinó que la mutación generaba una ganancia de función en situaciones de estrés  $\beta$ -adrenérgico, lo que explicaba los casos de MSC en estrés emocional y/o físico de los individuos jóvenes de esta familia. Estudios posteriores propusieron que la variabilidad en la penetrancia y expresividad del fenotipo en la familia podría ser explicada por una disminución de la cantidad de proteína del RYR2 provocada por la mutación.

La posibilidad de generar cardiomiocitos a partir de células madre pluripotentes inducidas (iPSC-CM) de los individuos portadores de la mutación *RYR2\_p.G357S* abre la posibilidad de estudiar cómo la mutación alteraría la función del RYR2 nativo en cardiomiocitos específicos del paciente, a diferencia de los canales recombinantes, y cómo se podría relacionar el patrimonio genético del individuo con el fenotipo celular

## Resumen

observado. Con esta base nos propusimos investigar los mecanismos celulares fundamentales de la relación genotipo-fenotipo asociados a la mutación, partiendo de la hipótesis central para esta tesis de que **la ganancia de función asociada a la mutación RYR2\_p.G357S es dependiente del número de alelos mutados y del patrimonio genético de los individuos donantes.**

Partiendo de esta hipótesis central se estudió el efecto de la mutación sobre la función del RYR2 en iPSC-CM obtenidos de biopsias de piel de cinco individuos donantes. También, se secuenció el genoma completo de los individuos. Dos de los individuos (CPVT-53 y CPVT-54) presentaban la mutación RYR2\_p.G357S en homocigosis, mientras que los otros tres la presentaban en heterocigosis (CPVT-51, CPVT-52 y CPVT-55). El individuo CPVT-51 (sufrió un episodio de presíncope a los 19 años y una MSC recuperada a los 21 años) y el individuo CPVT-55 (no se le conocía sintomatología) eran hermanos. El individuo CPVT-52 (heterocigoto, sufrió un síncope a los 39 años) y el individuo CPVT-53 (homocigoto, sufrió un síncope a los 8 años) tenían un parentesco de segundo grado ya que eran primera y tercera generación, respectivamente, del mismo núcleo familiar. El individuo CPVT-54, no tenía ningún parentesco con los individuos anteriores, y había sufrido dos episodios de síncope, el primero a los 8 años. Todos los individuos estaban bajo tratamiento con  $\beta$ -bloqueantes excepto el individuo CPVT-52 que lo abandonó. Todos los individuos sintomáticos (CPVT-51, CPVT-52, CPVT-53 y CPVT-54) tenían un desfibrilador automático implantado mientras que el individuo asintomático (CPVT-55) seguía recomendaciones de estilo de vida.

Para estudiar el efecto de la mutación RYR2\_p.G357S sobre la dinámica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, primero analizamos los transitorios de  $\text{Ca}^{2+}$  inducidos por estimulación eléctrica de campo de los iPSC-CM derivados de cada individuo. En estos experimentos no fue posible determinar cambios en el acoplamiento excitación-contracción. En cambio, los transitorios inducidos por estimulación farmacológica directa, utilizando cafeína 10 mM, mostraron un aumento de función generalizado del RYR2 en todas las líneas celulares portadoras de la mutación respecto al control sano. Esta ganancia de función se observó tanto en condiciones basales como de estimulación  $\beta$ -adrenérgica con isoproterenol (ISO) 100 nM. Sin embargo, no se distinguió un patrón asociado al número de alelos mutados.

## Resumen

Seguidamente realizamos experimentos concentración-respuesta de cafeína i ajustamos la función de Hill a los puntos experimentales. Estos experimentos mostraron que en condiciones basales, todas las líneas portadoras de la mutación RYR2\_p.G357S presentaban una sensibilidad a la cafeína mayor que los iPSC-CM del individuo control sano. Aún así, los iPSC-CM del individuo homocigoto CPVT-53 presentaban una ganancia de función aún mayor que las otras líneas portadoras. Sorprendentemente, la activación  $\beta$ -adrenérgica no sólo no produjo un mayor aumento de la función en los iPSC-CM de los portadores de la mutación, sino que en dos de estas líneas la función disminuyó. A diferencia de los iPSC-CM del control sano, la presencia de ISO 100 nM no provocó un cambio significativo de la respuesta a cafeína en los cardiomiocitos de los individuos heterocigotos CPVT-51 y CPVT-55, ni en los del individuo homocigoto CPVT-54. Más aún, los iPSC-CM del individuo homocigoto CPVT-53 y del heterocigoto CPVT-52 mostraron una caída en la sensibilidad a la cafeína en presencia de ISO 100 nM. La sensibilidad a cafeína de los iPSC-CM del individuo CPVT-53 disminuyó hasta el nivel de los iPSC-CM de los individuos CPVT-51, CPVT-54 y CPVT-55. En cambio, la sensibilidad a la cafeína de los iPSC-CMs del individuo CPVT-52 disminuyó hasta casi el nivel de sensibilidad de los iPSC-CM del control sano en condiciones basales. Estas respuestas anómalas a la activación  $\beta$ -adrenérgica por parte de las líneas portadoras de la mutación RYR2\_p.G357S sugieren un grado de disfuncionalidad del canal que podría estar en la base de las arritmias letales de la enfermedad.

Aunque los iPSC-CM de los individuos CPVT-51 y CPVT-55 (hermanos heterocigotos) no mostraron grandes diferencias funcionales, más allá de una mayor respuesta en los transitorios inducidos por cafeína 10 mM de los iPSC-CM del individuo CPVT-51, en los informes clínicos se registró una MSC recuperada por parte del individuo CPVT-51 mientras que el individuo CPVT-55 se mantuvo asintomático. El estudio de las variantes únicas en el genoma del individuo CPVT-51 sugirió que la severidad de su fenotipo podría explicarse por el efecto modulador de las variantes de significado incierto *SCN11A\_c.A5366G* (Nav1.9\_p.H1789R) y *TTN\_c.G51662A* (TTN\_p.R17221H).

En cuanto a los individuos CPVT-52 y CPVT-53, su grado de parentesco sugería la presencia de un factor genético que actuaría como protector hacia el sustrato proarrítmico. El análisis de los genomas de los individuos CPVT-52 y CPVT-53 no nos



## Resumen

permitió determinar si alguna de las variantes compartidas podría ser la responsable de la disminución de la función observada en los iPSC-CM correspondientes en presencia de ISO 100 nM.

La mutación RYR2\_p.G357S muestra una baja penetrancia dentro de la familia, este hecho se había asociado a la desestabilización del dominio N-terminal del RYR2 que producía la disminución de la cantidad de proteína observada en el modelo celular HEK-293T. De acuerdo con esto, la desestabilización del dominio N-terminal de la proteína puede producir tanto una ganancia de función como una pérdida de función a través de la reducción del número de canales de RYR2. En contraposición al modelo heterólogo, nuestro modelo nativo de cardiomiocitos específicos de pacientes nos permitió determinar que la cantidad de proteína RYR2 no se veía afectada por la mutación.

Todos los resultados en conjunto sugieren que la ganancia de función causada por la mutación RYR2\_p.G357S en condiciones basales y su respuesta anómala a la estimulación  $\beta$ -adrenérgica es el sustrato arritmogénico necesario para que se formen las arritmias malignas. La baja penetrancia y expresividad de la mutación en la gran familia de la Isla de Gran Canaria no está dada por la degradación de RYR2. Sino que variantes individuales, como las encontradas en este estudio, podrían aumentar o disminuir la severidad del fenotipo de los individuos portadores de la mutación.

## Summary

### SUMMARY

Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT) is an inherited disease characterized by the appearance of ventricular arrhythmias triggered by physical or emotional stress situations that can cause syncope, cardiac arrhythmias, and sudden cardiac death (SCD) in young individuals with a structural normal heart. Over 50% of CPVT cases diagnosed are associated with mutations in the type 2 ryanodine receptor (*RYR2*) gene. These mutations show incomplete penetrance and variable expressivity, suggesting that genetic background of individuals plays a modulatory role in the disease phenotype.

Between 1994-2007 in the south part of the Grand Canary Island 11 cases of SCD in emotional or physical stress were identified in young individuals. These individuals came from four apparently not related families, however it was suspected that the cases could be related. An extensive genealogical study allowed to connect the four families in a large genealogical tree formed by more than 2000 individuals with a common ancestor born in 1749. Genetic analysis identified the mutation *RYR2\_c.G1069A* (*RYR2\_p.G357S*) as the possible cause of the CPVT cases that lead to SCD in the mutation carriers in this large family. Initially, 179 alive mutation carrier individuals, and 36 deceased individuals were identified. Among the latter, six of the cases were positive for the mutation and the remaining cases had died in documented circumstances highly suggestive of CPVT. Studies performed with HEK-293T cells determined that the mutation produces a gain of function when the  $\beta$ -adrenergic pathway was stimulated. This would explain the SCD cases of young individuals in this family during emotional and/or physical stress. A further study suggested that the variability in the penetrance of the mutation, and in its phenotype expressivity could be due to a reduction in the amount of *RYR2* protein caused by the mutation.

The possibility to generate patient-specific cardiomyocytes from *RYR2\_p.G357S* mutation carriers, provides the opportunity to study the functional outcome of native *RYR2* mutant channels, (as opposed to recombinant channels) and to link the observed cellular phenotype to the genetic background of the patient. Using this cellular model, we investigated the cellular mechanisms involved in the relationship between genotype-

## Summary

phenotype associated to the mutation. The central hypothesis of this thesis is that **the gain of function associated to the RYR2\_p.G357S mutation is dependent on the number of mutated alleles and the genetic background of the donors.**

Following this central hypothesis, we studied the functional effect of the mutation in iPSC-CM derived from skin biopsies from five donors. We also performed whole genome sequence of the five individuals. Two of the individuals (CPVT-53 and CPVT-54) were homozygous for the mutation RYR2\_p.G357S, and the other three individuals (CPVT-51, CPVT-52, and CPVT-55) carried the mutation in heterozygosity. The individual CPVT-51 (suffered a presyncope at the age of 19 and a rescued SCD at the age of 21) and the individual CPVT-55 (asymptomatic) were siblings. The individual CPVT-52 (suffered a syncope at the age of 39) and the CPVT-53 (homozygous, suffered a syncope at the age of 8) were grandparent and grandchild, respectively. The individual CPVT-54 (suffered two syncopes, the first one at the age of 8), was not a close relative of any of the donors. All the individuals were under  $\beta$ -blockers treatment except the individual CPVT-52 who discontinued the treatment. All symptomatic individuals (CPVT-51, CPVT-52, CPVT-53, and CPVT-54) have an implantable cardioverter-defibrillator whilst the asymptomatic individual (CPVT-55) only follows lifestyle recommendations.

To study the effect of the RYR2\_p.G357S mutation on the intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  dynamics, we first studied  $\text{Ca}^{2+}$  transients from patient-specific iPSC-CM paced with electric field stimulation. In this experimental series, patient-specific iPSC-CM from either control or mutation carriers show similar excitation-contraction coupling parameters. We next performed experiments using pharmacological stimulation of iPSC-CM with a short pulse of 10 mM caffeine and observed a generalized increase in the RYR2 function in all the mutation carrier cell lines compared to the healthy control. We observed this gain of function in basal conditions as well as in conditions of  $\beta$ -adrenergic stimulation with isoproterenol (ISO) 100 nM. Despite these results, we were not able to distinguish a pattern between cell lines from individuals with the same number of mutated alleles.

We next performed caffeine concentration-response experiments and fitted experimental points to a Hill equation. In basal conditions, all iPSC-CM from RYR2\_p.G357S mutation carriers showed a higher caffeine sensitivity than control iPSC-CM. The highest caffeine sensitivity was observed in the iPSC-CM corresponding to

## Summary

homozygous individual CPVT-53. Surprisingly,  $\beta$ -adrenergic stimulation failed to further increase the caffeine sensitivity of iPSC-CM from mutation carriers, unlike the healthy control iPSC-CM which caffeine sensitivity was significantly increased. The presence of ISO 100 nM did not induce any significant change in the caffeine sensitivity of iPSC-CM from heterozygous CPVT-51 and CPVT-55 individuals, or the iPSC-CM from the homozygous CPVT-54 individual. Interestingly, caffeine sensitivity of CPVT-53 iPSC-CM decreased to levels similar to that of CPVT-51, CPVT-54, and CPVT-55 iPSC-CM, and furthermore, CPVT-52 iPSC-CM showed a decrease in the caffeine sensitivity that decreased to a level as low as that of the healthy control iPSC-CM in basal conditions. These abnormal responses to  $\beta$ -adrenergic activation suggest that channel dysfunctionality due to the RYR2\_p.G357S mutation is at the base of the lethal arrhythmias in this family.

Although the iPSC-CM of the CPVT-51 and CPVT-55 individuals (heterozygous siblings) did not show big functional differences, only a greater response in transients induced by 10 mM caffeine of CPVT-51 individual iPSC-CM, the individual CPVT-51 suffered a rescued SCD whilst individual CPVT-55 remained asymptomatic. The analysis of unique genomic variants from individual CPVT-51 suggests that the variants of uncertain significance *SCN11A\_c.A5366G* (Nav1.9\_p.His1789Arg), and *TTN\_c.G51662A* (TTN\_p.Arg17221His) can account for the severity of their phenotype. We also look for common variants between close related individuals CPVT-52 and CPVT-53 that may explain the decrease in the RYR2 function observed in their corresponding iPSC-CM in the presence of ISO 100 nM. None of the common variants found suggested us a likely mechanism for this abnormal cellular response to ISO.

The mutation RYR2\_p.G357S displays low penetrance in this family that had been associated to a decrease in the amount of protein observed in HEK-293T cells. According to this, the destabilization of the N-terminal domain of the RYR2 protein due to de mutation, may produce both, a gain of function and a loss of function trough a reduction in the number of RYR2 channels. However, we can rule out that mechanism since in our model of native patient-specific cardiomyocytes the amount of the RYR2 protein was not affected by the mutation.

## Summary

All together our results suggest that the gain of function caused by the RYR2\_p.G357S mutation in basal conditions and the anomalous response to  $\beta$ -adrenergic stimulation constitutes the arrhythmogenic substrate necessary for the formation of malignant arrhythmias. The low penetrance and variable expressivity of the mutation in this large family is not caused by RYR2 protein degradation. The individual variants, like the variants identified in this study, could increase or decrease the severity of the phenotype in individuals carrying the mutation.

# **I. INTRODUCCIÓ**



## Introducció

### 1. La mort sobtada al sud de l'Illa de Gran Canària

L'any 1995 a Sant Bartolomé de Tirajana, un petit municipi situat al sud de l'Illa de Gran Canària, es va registrar la mort sobtada d'un noi de 21 anys mentre conduïa. Dos anys més tard, l'any 1997, una cosina seva va morir a 21 anys mentre caminava per la muntanya.

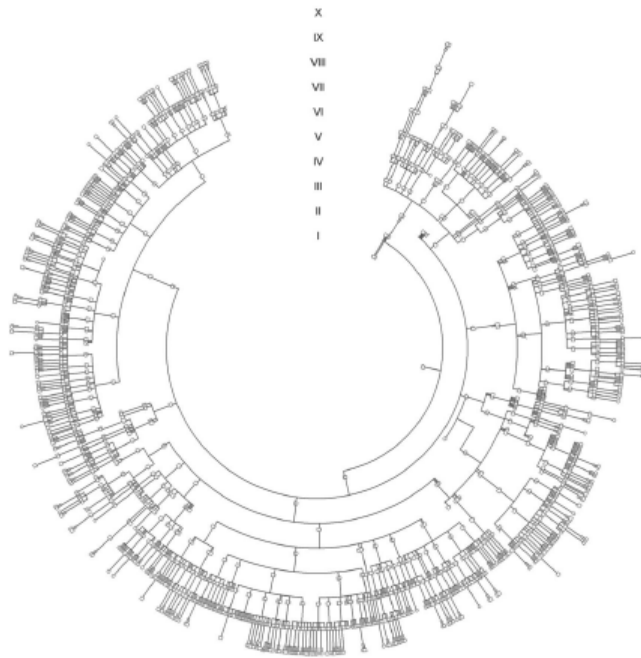
Pocs anys després a l'any 2002 la filla gran d'una família amb quatre filles, també de l'Illa de Gran Canària, va morir de forma sobtada mentre jugava. Aquest cas va fer saltar les alarmes i es van fer estudis a les altres tres germanes. Malgrat això, no es va trobar cap anomalia estructural ni elèctrica al cor. Un any després de la mort de la germana gran, una altra germana va morir a 10 anys mentre nedava. L'any 2007, una altra va morir a 13 anys mentre estava en un parc d'atraccions.

Tots aquests casos de mort sobtada registrats en individus de famílies aparentment no relacionades tenien diversos factors comuns: tots es produïen en situacions d'estrès emocional o físic, els individus afectats eren joves d'entre 10 i 26 anys i tots els casos s'havien donat en famílies que habitaven una petita regió al sud de l'Illa de Gran Canària. Totes aquestes coincidències van fer pensar que els casos podien estar relacionats.

Un estudi genealògic, finalitzat l'any 2004, va demostrar que totes les famílies en les quals s'havien registrat casos compartien un avantpassat comú nascut el 1749. Aquesta gran família va resultar estar formada per més de 2000 individus i més de 400 famílies (Figura 1).



## Introducció



**Figura 1. Pedigrí de la Gran Família de l'Illa de Gran Canària. Es mostren els 2000 individus vius que comparteixen un avantpassat comú.** Obtinguda de Wangüemert i col·laboradors (2015)<sup>1</sup>.

El fet que tots els casos de mort sobtada s'haguessin donat en situacions d'estrès emocional o físic va fer sospitar als investigadors que la responsable de les morts podria ser la taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT), però fins al moment se'n desconeixia la causa.

Per aquest motiu, Wangüemert i col·laboradors (2015) van realitzar l'estudi genètic dels 2000 individus que formaven aquesta gran família. L'estudi genètic va revelar la presència de la mutació c.1069G>A al receptor de rianodina tipus 2 (RYR2, RYR2\_p.G357S) en els individus que havien patit mort sobtada. En aquest treball, els estudis funcionals realitzats per investigadors del nostre grup van demostrar el comportament patogènic de la mutació en situacions que simulaven l'estrès  $\beta$ -adrenèrgic.<sup>1</sup> Aquest fet podria explicar els casos de mort sobtada registrats fins al moment a l'Illa de Gran Canària.

Dins aquesta gran família, es van identificar inicialment 179 portadors vius d'aquesta mutació i 36 subjectes morts, dels quals 6 eren genotip positiu i els altres havien mort en circumstàncies documentades altament suggestives de CPVT. A nivell clínic, es va aplicar un protocol de control exhaustiu basat en proves d'esforç, ecografies i Holter combinat amb el tractament amb  $\beta$ -bloquejants. Únicament es van registrar casos de

## Introducció

mort sobtada cardíaca (MSC) en els individus que no van voler participar en el diagnòstic genètic.

La mutació RYR2\_p.G357S representa un clar cas de mutació fundadora. Tots els casos registrats fins al moment de CPVT a l'illa de Gran Canària estan associats a portadors d'aquesta mutació en homozigosi o heterozigosi. Tot i que aquesta mutació hagi estat estudiada en un model d'expressió heteròloga, queden moltes incògnites per explicar el comportament d'aquesta mutació en aquesta gran família. Per aquest motiu, en la present tesis doctoral estudiarem en detall els mecanismes patogènics de la mutació en cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes dels propis pacients. D'aquesta manera volem explicar de forma més acurada el comportament de la mutació en un context fisiològic semblant al cardíac i entendre el paper del llinatge genètic sobre l'expressivitat i la penetrància del fenotip associat a la mutació.

### **2. Mort sobtada cardíaca**

Es defineix com a MSC la mort inesperada causada per una condició cardíaca que es dona una hora després de l'aparició dels símptomes.<sup>2,3</sup> La MSC és una de les causes més comunes de mort arreu del món, amb una freqüència de 1.3-2.28 casos per 100.000 habitants en individus joves menors de 35 anys.<sup>4</sup> La MSC és una de les principals causes de mort als països occidentals i és responsable de la majoria de les morts per malalties cardiovasculars. Anualment a Europa moren sobtadament 300.000 persones.<sup>2,3</sup>

Molts dels casos de MSC en pacients per sobre els 35 anys són causades per problemes coronaris o isquèmics. Pel contrari, la MSC en individus menors de 35 anys sovint és causada per malalties arritmogèniques amb o sense una alteració estructural del cor associada. Aquestes malalties són el resultat d'alteracions genètiques heretables com les cardiomiopaties i les canalopaties.<sup>5</sup>

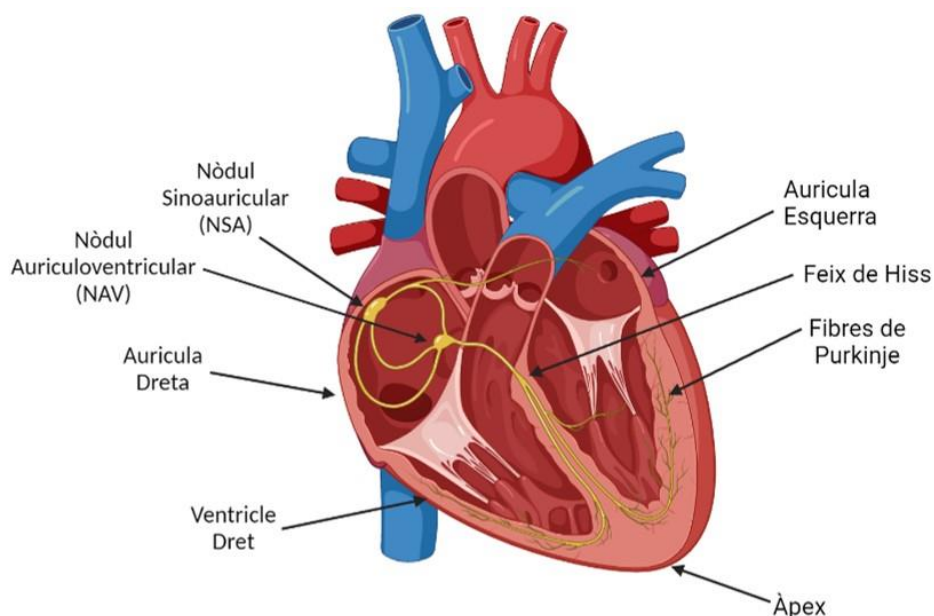
Les cardiomiopaties són un seguit de patologies que indueixen anomalies estructurals al cor. Les principals cardiomiopaties són la cardiomiopatia hipertròfica (1 cas cada 500 individus), cardiomiopatia dilatada (1 cas cada 2500 individus) i la cardiomiopatia arritmogènica de ventricle dret (1 cas cada 2000-5000 individus).<sup>6</sup> Aquestes normalment són resultat d'alteracions genètiques en les proteïnes que formem els desmosomes, sarcòmers o citoesquelet.

## Introducció

Les canalopaties, en canvi, són patologies hereditàries provocades per mutacions en gens que codifiquen per canals iònics, localitzats a la membrana o orgànuls cel·lulars, o en subunitats reguladores que trenquen el balanç dels corrents iònics. Aquestes mutacions alteren les propietats biofísiques o la quantitat de canals iònics modificant el potencial d'acció cardíac (PAC) o l'acoblament excitació-contracció (E-C) dels cardiomiòcits. Aquest fet provoca arrítmies mortals en absència de defectes estructurals en el cor. Les principals canalopaties són la Síndrome de Brugada (1 cas cada 5000 individus), la síndrome de QT llarg (1 cas cada 5000-20000 individus) i la CPVT (1 cas cada 10000 individus).<sup>5,7,8</sup>

### 2.1. Activitat elèctrica del cor

Cada un dels batecs del cor s'inicia al nòdul sinoauricular (NSA). Aquest nòdul està format per uns miòcits cardíacs especialitzats anomenats marcapassos. Aquestes cèl·lules tenen corrents auto-despolaritzants que les despolaritzen de forma espontània, fins a arribar al llindar, i així iniciar cada batec. El PAC es propaga per l'aurícula fins al nòdul auriculoventricular (NAV) i es seguirà propagant a través de les fibres de Purkinje que formen el sistema de conducció fins a l'apex, provocant la contracció dels ventricles (Figura 2).



**Figura 2. Representació esquemàtica de l'anatomia del cor humà.** Creada amb Biorender.com.

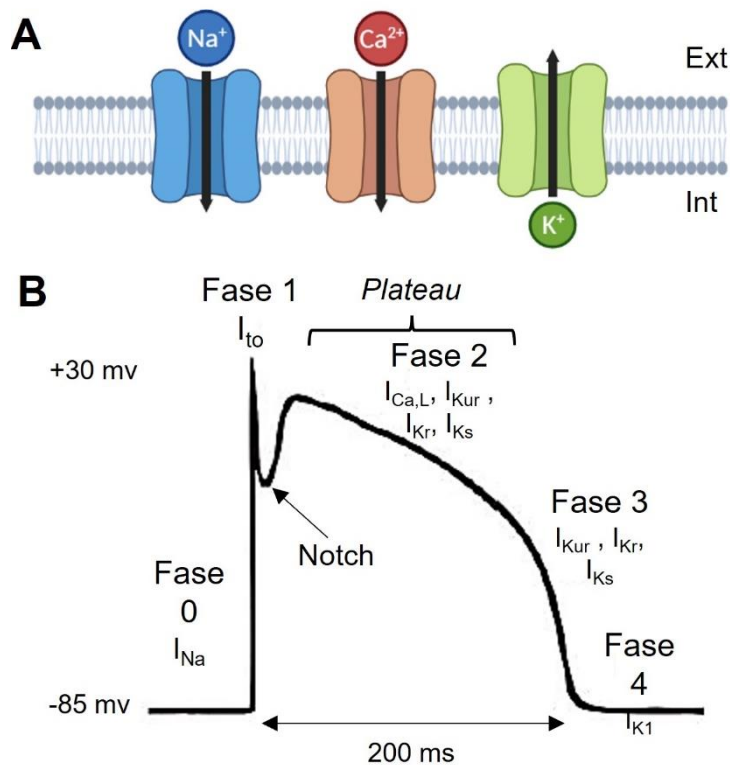
Aquest impuls elèctric està estrictament governat per l'obertura i tancament coordinat de diferents canals dependents del voltatge, que permeten el pas de corrents iònics a

## Introducció

través de la membrana cel·lular cap a l'interior o l'exterior de la cèl·lula segons els seus gradients electroquímics. Els corrents anomenats entrants (per convenció), representen el moviment de cations de l'exterior cap al citoplasma de la cèl·lula i despolaritzen la membrana cel·lular. Els principals corrents despolaritzants són els corrents de  $\text{Na}^+$  ( $I_{\text{Na}}$ ) i de  $\text{Ca}^{2+}$  ( $I_{\text{Ca,L}}$ ). Per un altra banda, els corrents de cations que van del citoplasma cap a l'exterior de la cèl·lula (o d'anions en sentit contrari) s'anomenen corrents sortints i són corrents repolaritzants, principalment de  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{to}}$ ,  $I_{\text{Kur}}$ ,  $I_{\text{Kr}}$ ,  $I_{\text{Ks}}$ ,  $I_{\text{K1}}$ ) (Figura 3A). El PAC doncs és el resultat dels fluxos d'aquests corrents iònics a cada batec i es pot dividir en 4 fases (Figura 3B)<sup>9</sup>:

- La **fase 4** o de repòs ve principalment determinada, tant en aurícula com en ventricle, pel corrent rectificador entrant  $I_{\text{K1}}$  que manté el potencial de la membrana dels cardiomiòcits al voltant de -85mV.
- La **fase 0** consisteix en la despolarització ràpida de la membrana donada pel corrent de sodi dependent de voltatge  $I_{\text{Na}}$ . En aquesta fase el potencial de membrana arriba fins al voltant de +40mV en 2 ms.
- La **fase 1** és una repolarització primerenca en la qual hi ha una sortida transitòria de ions  $\text{K}^+$  ( $I_{\text{to}}$ ), al mateix temps que es produeix la inactivació del corrent  $I_{\text{Na}}$ . Aquesta fase produeix un potencial més negatiu conegut com a "notch" que pot ser més o menys marcat a diferents regions del cor.
- La **fase 2** és una fase de *plateau* i representa el balanç entre el corrent despolaritzant de calci de tipus L ( $I_{\text{Ca,L}}$ ) i els corrents repolaritzants cap a l'exterior de  $\text{K}^+$  ultra ràpid ( $I_{\text{Kur}}$ ), ràpid ( $I_{\text{Kr}}$ ) i lent ( $I_{\text{Ks}}$ ).
- La **fase 3** és la fase de repolarització i és on dominen els corrents de repolarització tardans després de la inactivació del corrent  $I_{\text{Ca,L}}$ . La repolarització final es dona pel corrent rectificadora de potassi ( $I_{\text{K1}}$ )<sup>9</sup>.

## Introducció



**Figura 3. Potencial d'acció cardíac ventricular.** A. Direcció dels corrents iònics que formen el potencial d'acció cardíac. B. Fases del potencial d'acció cardíac ventricular amb els corrents iònics que intervenen en cada una de les fases.

### 2.2. Acoblament Excitació-Contracció

L'acoblament E-C és el procés mitjançant el qual l'impuls elèctric del PAC produeix la contracció mecànica mediada per l'augment dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars. Perquè aquest procés es pugui donar correctament és necessària la regulació dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars tant en la sístole com en la diàstole. A la Figura 4A es mostra de forma esquemàtica aquest procés.

#### 2.2.1. Alliberació del calci intracel·lular

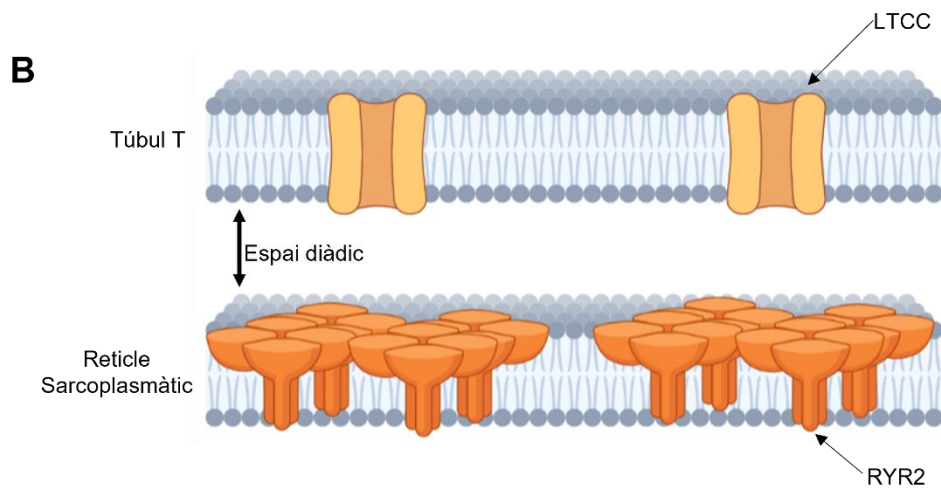
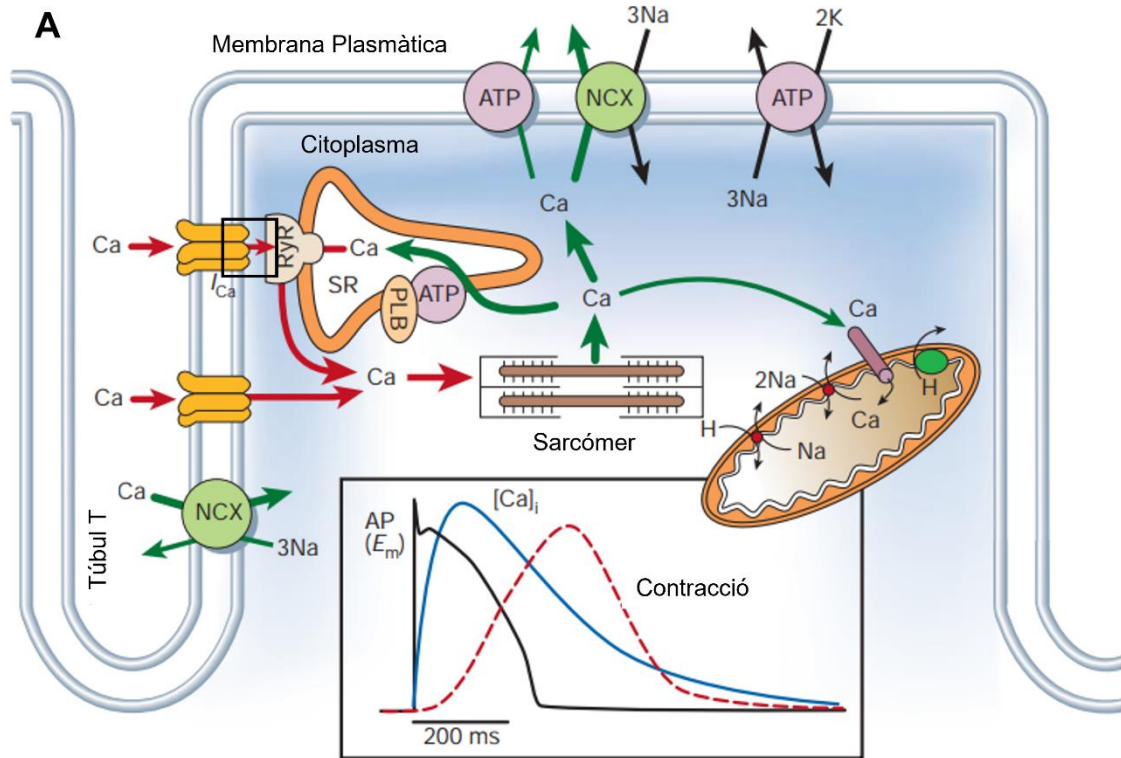
En els cardiomiòcits adults, els canals de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipus L (LTCC) es troben situats al llarg dels túbuls T. Els túbuls T són invaginacions de la membrana d'uns 150-300 nm de llarg estretament unides al reticle sarcoplasmàtic, el reservori principal de  $\text{Ca}^{2+}$  en els cardiomiòcits. A la membrana dels túbuls T se situen els LTCC i a la membrana del reticle sarcoplasmàtic es troben els RYR2 organitzats en regions d'aproximadament 200 nm de diàmetre on es troben més 100 RYRs.<sup>10-12</sup> Entre ambdues estructures es forma un espai

## Introducció

d'aproximadament 15 nm molt important en l'acoblament E-C, que s'anomena espai diàdic (Figura 4 A i B).

Durant la fase de *plateau* del potencial d'acció (fase 2, Figura 3B) els LTCC permeten l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'exterior. Això farà que augmenti molt la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  a l'espai diàdic, fins a més de 10  $\mu\text{M}$ , provocant que els RYR2 s'obrin i permetin la sortida massiva i autoregenerativa de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic cap al citoplasma augmentant la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  entre els 100 i 200  $\mu\text{M}$ . Aquest procés és l'anomenat *Calcium induced calcium release (CICR)*. L'obertura dels RYR2 es pot produir per la unió d'entre 2-4 ions de  $\text{Ca}^{2+}$ , i els canals adjacents podran ser oberts per l'augment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  local o per una obertura acoblada dels RYR2. L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  a l'espai diàdic tant per l'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  de l'exterior com per la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic, produirà la inactivació depenent de  $\text{Ca}^{2+}$  modulada per la calmodulina dels LTCC. El  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat present en el citoplasma s'unirà a la troponina C dels miofilaments, induint un canvi conformacional que permetrà la interacció entre la miosina i l'actina del sarcòmer perquè es produeixi la contracció cardíaca (Figura 4A).<sup>10,11</sup>

## Introducció



**Figura 4. Acoblament excitació-contracció.** **A.** Representació esquemàtica de l'acoblament excitació contracció. L'entrada i alliberació de  $Ca^{2+}$  s'indica amb fletxes vermelles, la recaptació del  $Ca^{2+}$  amb fletxes verdes i el quadre negre indica l'espai diàdic. Modificada de Bers, 2002<sup>10</sup>. **B.** Representació esquemàtica de l'espai diàdic on s'observa la localització dels LTCC a la membrana del túbul T i la presència dels RYR2 a la membrana del reticle sarcoplasmàtic. Creada amb Biorender.

## Introducció

### 2.2.2. Recaptació del calci intracel·lular

El  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat durant l'acoblament E-C, és ràpidament recaptat del citoplasma. Hi ha quatre sistemes principals que s'encarreguen de la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$ . Un 70% del  $\text{Ca}^{2+}$  serà recaptat cap al reticle sarcoplasmàtic per la SERCA2, una ATPasa que transporta de forma activa el  $\text{Ca}^{2+}$  cap dins el reticle sarcoplasmàtic. El 28% del  $\text{Ca}^{2+}$  serà transportat cap a l'exterior a través de l'intercanviador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  (NCX). El 2% restant, podrà ser transportat cap fora de la cèl·lula per la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa, o emmagatzemat al mitocondri (Figura 4 A).<sup>10</sup>

SERCA2 és una ATPasa localitzada a la membrana del reticle sarcoplasmàtic. La seva activitat controla la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  recaptat del citosol i el grau de  $\text{Ca}^{2+}$  acumulat dins el reticle sarcoplasmàtic, sent així una de les proteïnes clau tant en la relaxació com en la contracció. L'activitat de SERCA2 es veu altament regulada per la unió de la proteïna fosfolamban (PLN). PLN es troba dins un equilibri dinàmic entre l'estat de monòmer i oligòmer. Quan no es troba fosforilat, PLN es presenta com a monòmer inhibint l'activitat de SERCA2. Quan PLN és fosforilat per la proteïna quinasa A (PKA) o el nivell de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic és elevat, PLN forma pentàmers. La interacció de SERCA2 amb els pentàmers de PLN augmenta la taxa de recaptació de SERCA2, sent dependent del nombre de pentàmers de PLN presents.<sup>13,14</sup>

L'intercanviador NCX es troba localitzat principalment als túbuls T pròxims a les regions on es concentren els LTCC. En mode directe, intercanvia tres ions  $\text{Na}^+$  cap a l'interior de la cèl·lula per dos ions  $\text{Ca}^{2+}$  cap a l'exterior a través de la membrana plasmàtica. Aquest intercanvi desigual de càrregues genera un flux net de corrent despolaritzant en el miòcit. El sentit de transport dels ions  $\text{Na}^+$  i  $\text{Ca}^{2+}$  depèn però de la concentració local d'aquests ions a l'espai diàdic. Quan es produeix el PAC, la concentració local de  $\text{Na}^+$  augmenta provocant que NCX operi en mode revers. En aquestes circumstàncies, NCX transporta  $\text{Na}^+$  cap a l'exterior i introdueix  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol ajudant a augmentar la concentració local de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquesta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  pels intercanviadors NCX als espais diàdics podria contribuir a l'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  a través del reticle.<sup>15</sup> Quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  és molt elevada, NCX opera en mode directe intercanviant  $\text{Ca}^{2+}$  cap a l'exterior de la cèl·lula i introduint  $\text{Na}^+$  al citoplasma per així finalitzar la contracció.<sup>16,17</sup>



## Introducció

### 2.2.3. Finalització del CICR

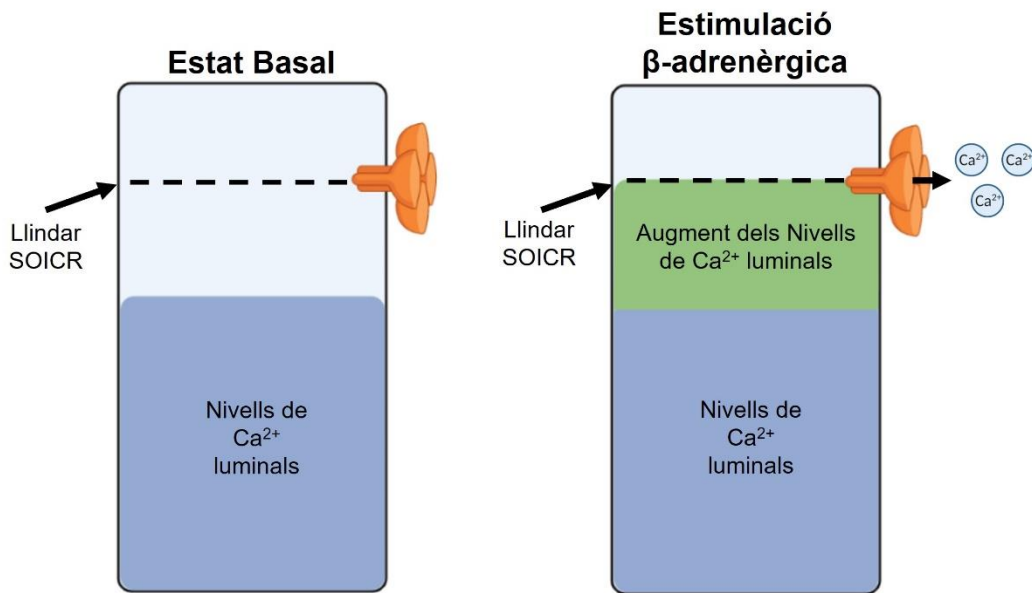
Com que el CICR és un procés autoregeneratiu, cal analitzar quins són els mecanismes que el finalitzen. Existeixen 5 possibles mecanismes que podrien regular aquest procés: (1) inactivació o adaptació dels RYR2 temps-dependent, descriu el fenomen pel qual cada un dels receptors de rianodina (RYRs) es tancaria produint així la finalització de la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic. (2) Per un fenomen estocàstic, descriu el fenomen probabilístic que tots els RYRs situats en una mateixa regió de l'espai diàdic es tanquin al mateix temps permetent una dissipació local del  $\text{Ca}^{2+}$  que acabaria amb el CICR. (3) Canvis en l'obertura dels RYRs dependents dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  en el reticle sarcoplasmàtic causat per la presència d'un sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal en els RYRs o per proteïnes accessòries com podria ser la calseqüestrina. (4) Acoblament al·lostèric entre RYRs, que fa que el tancament d'un RYR promogui el tancament dels altres. (5) La disminució dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat pels RYRs cap al citoplasma fan que els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic siguin insuficients per mantenir el CICR.<sup>18</sup>

### 2.2.4. Store Overload Induced Calcium Release (SOICR)

Durant l'acoblament E-C, el  $\text{Ca}^{2+}$  és principalment alliberat a través del RYR2 des del reticle sarcoplasmàtic perquè es pugui donar la contracció. Tot i així, també es pot donar la sortida espontània de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic sense la necessitat que s'hagi generat un PAC. Aquest fenomen s'anomena *Store Overload induced Calcium Release* (SOICR). El SOICR es dona per l'augment de la sensibilitat pel  $\text{Ca}^{2+}$  luminal dels RYR2 provocant una disminució en la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  necessària per a l'obertura del RYR2, podent-se produir sortides localitzades de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle cap al citoplasma anomenades *sparks*.<sup>19,20</sup>

En condicions anòmales, com seria el cas de la CPVT, els canals RYR2 poden ser activats a concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals inferiors que els canals *wild type* (WT). Aquest fenomen es pot veure agreujat amb l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica. Quan aquesta és activada, la recaptació de  $\text{Ca}^{2+}$  augmenta i, per tant, els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals augmenten i el llindar perquè es produeixi el SOICR és superat produint sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  que podran acabar generant arrítmies mortals als pacients (Figura 5).<sup>20</sup>

## Introducció



**Figura 5. Generació de l'activitat SOICR.** Nivells normals de Ca<sup>2+</sup> luminals no arriben al llindar per a generar sortides espontànies de Ca<sup>2+</sup> (esquerra). L'augment de Ca<sup>2+</sup> en el reticle supera el llindar de l'activitat SOICR i es generen sortides espontànies de Ca<sup>2+</sup> (dreta). Creada amb Biorender.

### 2.2.5. Estimulació beta-adrenèrgica dels cardiomiòcits

En situacions d'estrès emocional o físic, l'estimulació del sistema nerviós simpàtic induïx l'alliberació de les catecolamines produint l'activació de la via beta-adrenèrgica. Aquesta via regula el sistema circulatori perifèric, el metabolisme i la dinàmica del batec del cor per tal de donar la resposta visceral de "*Fly or fight*". A nivell cardíac aquesta resposta augmenta la força de contracció (inotropisme), accelera el ritme de relaxació (lusitropisme) i augmenta la freqüència cardíaca (cronotropisme) per donar resposta a l'augment de demanda metabòlica.<sup>10,21</sup>

Es coneixen tres tipus de receptors beta-adrenèrgics: beta1, beta2, beta3. Tots són glicoproteïnes amb el domini N-terminal extracel·lular, set dominis transmembrana hidrofòbics i un domini C-terminal intracel·lular. La regió hidrofòbica és essencial per a la unió de catecolamines, mentre que des del tercer domini transmembrana fins al domini C-terminal estan acoblats a l'heterodimèrica proteïna G. Al cor, principalment, el tipus de receptor més abundant és el beta1. L'activació dels receptors beta-adrenèrgics produeix la dissociació de la proteïna G fent que la subunitat G $\alpha$  activi l'adenilat ciclase (Fig. 6).<sup>21</sup>

## Introducció

L'adenilat ciclasa catalitza la síntesi d'AMP cíclic (cAMP) a partir d'ATP. L'augment de cAMP activa la PKA. La PKA consta de dues subunitats reguladores i dues subunitats catalítiques. La unió de dues molècules de cAMP a cada subunitat reguladora promou l'alliberació i activació de les subunitats catalítiques. Entre les proteïnes diana de fosforilació de la PKA en els cardiomiòcits hi ha els LTCC i el RYR2. La fosforilació d'aquests canals produirà que durant el PAC es doni una major entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  des de l'exterior. Incrementant la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic. L'augment d'activitat d'ambdós canals produirà un efecte inotròpic positiu, augmentant la força de contracció (Figura 6).<sup>10,22</sup>

El mecanisme pel qual es regula el ritme cardíac (cronotropisme) està controlat per les cèl·lules marcapàs localitzades al NSA, que es despolaritzen de forma espontània generant potencials d'acció de manera rítmica i autosostinguda. Hi ha dues teories que podrien explicar aquest fenomen. La primera teoria és que les cèl·lules marcapàs tenen un corrent despolaritzant anomenat *funny current* ( $I_f$ ) que s'activa a potencials negatius mitjançant l'obertura dels canals HCN4. Aquests canals catiónics inespecífics permeten el pas tant de ions  $\text{Na}^+$  com de ions  $\text{K}^+$  i s'obren quan la membrana es troba entre -65 i -50 mV. En aquestes condicions, el flux net de  $\text{Na}^+$  cap a l'interior provoca un canvi de potencial de membrana cap a voltatges menys negatius fins arribar al llindar d'activació dels canals de  $\text{Na}^+$  dependents del voltatge (-40 mV). En aquest punt es produeix l'activació massiva dels canals de  $\text{Na}^+$ , generant el PAC. Una vegada finalitzat el PAC, el potencial de membrana es trobarà al voltant de -65 mV la qual cosa torna a activar els canals HCN4 i es repeteix el cicle. El corrent  $I_f$  és el que determina el pendent de la despolarització diastòlica controlant la freqüència cardíaca.<sup>23,24</sup> Durant l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica la unió de cAMP als canals HCN4 produeix que hi hagi un augment del corrent. Augmentant el pendent de la despolarització i disminuint el temps necessari per arribar al llindar per iniciar el PAC augmentant així la freqüència cardíaca.<sup>24,25</sup>

L'altre teoria proposada és la "teoria del rellotge". Aquesta proposa que en diàstole, a les cèl·lules marcapàs es produeixen sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic a través de RYR2 cap al citoplasma que van augmentant la seva freqüència. Les sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  activen el corrent generat per l'intercanviador NCX en mode directe, el qual despolaritza la membrana fins que acaba

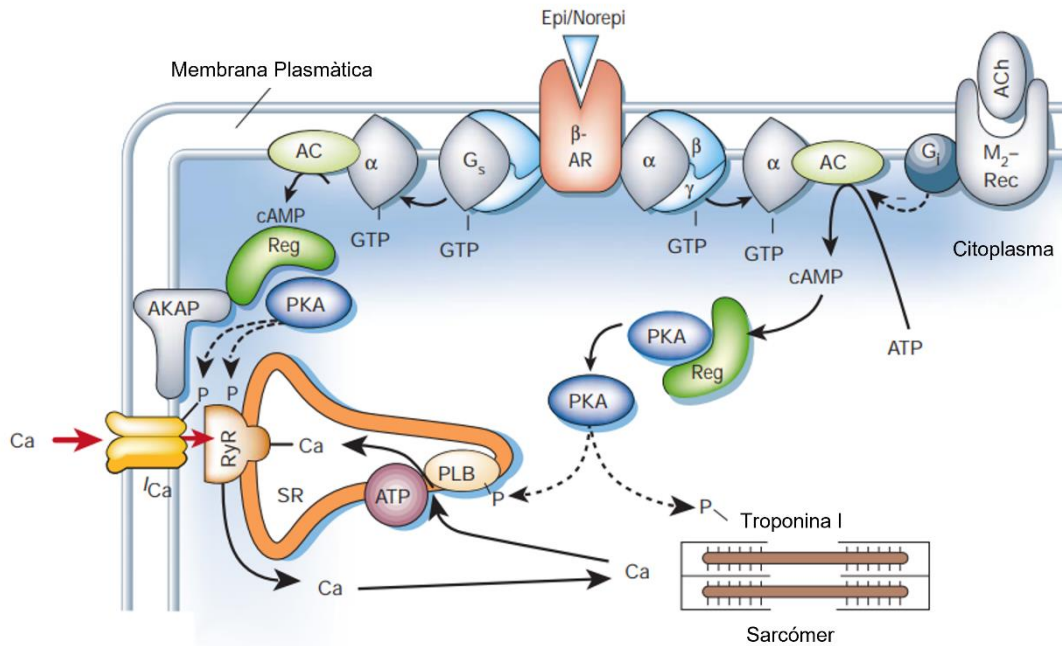
## Introducció

iniciant un PAC. Es creu que en estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, que provoca l'augment de càrrega del reticle sarcoplasmàtic, es produiria un increment en la freqüència de les sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  que faria disminuir el temps entre PAC augmentant així la freqüència cardíaca.<sup>24</sup> Tot i que els dos mecanismes podrien explicar l'augment de cronotropisme en estrès  $\beta$ -adrenèrgic, segueix en discussió quin és el mecanisme principal que ho regula.

L'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica també té un efecte sobre la velocitat de relaxació (lusitropisme). La relaxació de la contracció cardíaca es veu promoguda per la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  del citoplasma a través de l'intercanviador NCX i per la recaptació cap al reticle sarcoplasmàtic a través de la bomba  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa SERCA2. Durant l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, PLN i troponina I són fosforilades per la PKA. Per un costat, la fosforilació de la troponina I facilita la dissociació del  $\text{Ca}^{2+}$  dels miofilaments, degut a una disminució de la seva afinitat pel  $\text{Ca}^{2+}$ , facilitant la relaxació mecànica. Per l'altre, la fosforilació de PLN produeix un augment de la taxa de recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic cap al reticle sarcoplasmàtic reduint el  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol i augmentant la seva càrrega dins al reticle.<sup>26</sup> L'augment de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle es traduirà en una major alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  a cada batec.<sup>10</sup>

La resposta  $\beta$ -adrenèrgica es veu regulada per l'estat de maduresa dels cardiomiòcits. En cardiomiòcits immadurs s'ha vist que l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica indueix cronotropisme i lusitropisme positiu, però no s'ha vist cap efecte respecte l'inotropisme.<sup>27</sup> Els estudis realitzats per Huebsch i col·laboradors (2016) demostren que l'augment de maduresa dels cardiomiòcits augmenta l'inotropisme.<sup>28</sup> Ronaldson-Bouchard i col·laboradors (2018) determinen que la correcta resposta funcional  $\beta$ -adrenèrgica és dependent tant de les reserves de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular com de la proximitat dels LTCC i dels túbuls T. Per tant, una correcta resposta als agonistes  $\beta$ -adrenèrgics és indicatiu d'un alt nivell de maduresa fenotípica.<sup>29</sup>

## Introducció



**Figura 6. Via  $\beta$ -adrenèrgica.** Representació esquemàtica de la via  $\beta$ -adrenèrgica. Les fletxes discontinües mostren les dianes de fosforilació de la PKA. Adaptada de Bers i col·laboradors (2002)<sup>10</sup>.

### 3. Taquicàrdia ventricular polimòrfica catecolaminèrgica (CPVT)

La CPVT és una canalopatia hereditària que es caracteritza per presentar un electrocardiograma normal en repòs. Però, l'alliberació de catecolamines donada en situacions d'estrès emocional o físic indueix l'aparició d'arrítmies malignes com les taquicàrdies bidireccionals i/o polimòrfiques, que poden derivar en episodis de síncope o MSC en individus joves.<sup>30,31</sup>

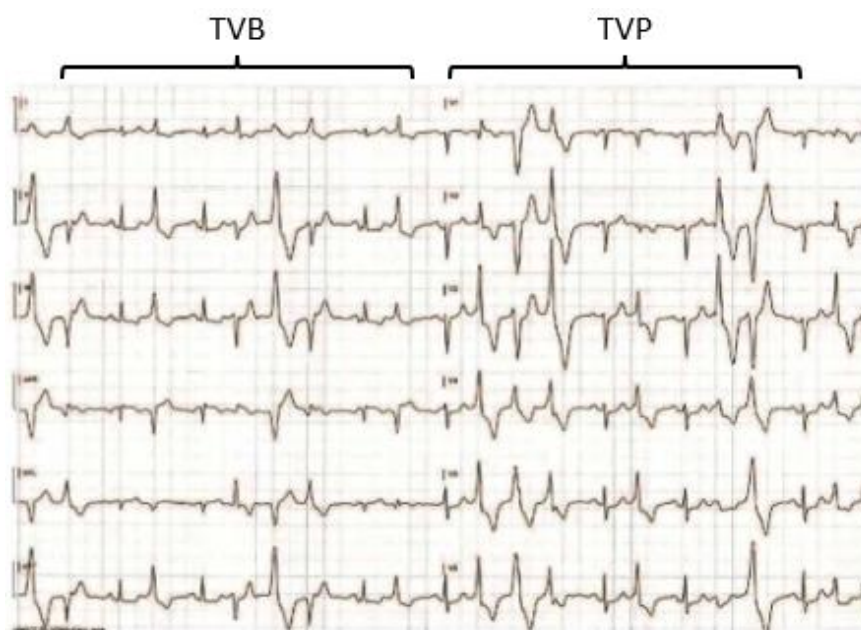
La descripció de la CPVT va començar l'any 1975 amb Reid i col·laboradors (1975), els quals van descriure la presència de taquicàrdies ventriculars produïdes per l'alliberació de catecolamines en una nena de 6 anys que havia patit dos episodis de síncope. Els primers estudis van mostrar com la pacient tenia un cor estructuralment normal i un electrocardiograma en repòs normal. Únicament van observar taquicàrdies ventriculars en prova d'esforç.<sup>32</sup> Coumel i col·laboradors l'any 1978 van descriure per primera vegada les tres característiques que identificaven la CPVT: (1) arrítmies ventriculars induïdes per estrès emocional o físic, (2) patró d'arrítmies ventriculars bidireccionals però electrocardiograma basal normal i (3) cor estructuralment normal.<sup>33</sup>

### 3.1. Característiques clíniques i diagnòsics

Els primers símptomes que mostra la CPVT són els síncope o la MSC tot i que també poden ser marejos o palpitations, en menor mesura. Tots aquests símptomes són generalment desencadenats per situacions d'estrès emocional o físic. Normalment, els primers símptomes apareixen al voltant dels 6-10 anys, tot i que també es poden manifestar a la segona dècada de vida i en casos excepcionals poden aparèixer al voltant dels 40 anys. El diagnòstic dels casos de CPVT es basen en la història familiar, la inducció de símptomes en situacions d'estrès emocional o físic, per proves d'esforç, Holter i infusió de catecolamines.<sup>34,35</sup>

Tots i les limitacions de les proves d'esforç, és una de les proves més fiables pel diagnòstic. Aquestes proves s'usen per a desencadenar de forma controlada arrítmies ventriculars malignes. Normalment, entre 100-120 batecs per minut es comencen a donar contraccions ventriculars prematures de forma aïllada seguides per arrítmies ventriculars no sostingudes. La prolongació d'aquest fenomen en el temps pot acabar generant arrítmies ventriculars sostingudes que poden derivar en taquicàrdies ventriculars bidireccionals (TVB) o polimòrfiques (TVP) (Figura 7).<sup>35,36</sup> A les TVP l'alternança del complex QRS no és constant, en canvi les TVB es caracteritzen per la rotació de 180° del complex QRS de batec a batec. Les TVB són indicatives de diagnòsics de la CPVT, però no s'observen freqüentment (Figura 7).<sup>37</sup>

## Introducció



**Figura 7. Electrocardiograma d'una prova d'esforç d'un pacient amb CPVT.** A la part inicial es mostren les taquicàrdies ventriculars bidireccionals (TVB) i a la part final es mostren les taquicàrdies ventriculars polimòrfiques (TVP). Adaptada de Lieve i col·laboradors (2016).<sup>37</sup>

### 3.2. Genètica de la CPVT

L'associació dels casos de MSC causat per la CPVT amb una base genètica va començar amb Leenhardt i col·laboradors l'any 1995. Aquests autors van fer un seguiment durant set anys de 21 nens menors de 12 anys que havien patit síncope relacionats amb taquicàrdies ventriculars polimòrfiques en situacions d'estrès emocional o físic. Un 30% dels individus seguits tenien antecedents familiars de MSC. Aquest fet donava indicis que podia haver-hi una base hereditària en aquests casos.<sup>38</sup>

No va ser fins a l'any 1999 que Swan i col·laboradors van estudiar dues famílies no relacionades entre les quals s'havien registrat sis casos MSC en situació d'estrès. En aquestes famílies es va poder determinar que el locus 1q42-43 era el responsable de la malaltia.<sup>39</sup> L'any 2001, Piori i col·laboradors i Laitinen i col·laboradors van començar a associar mutacions al gen *RYR2*, localitzat dins aquest locus, com a causants dels casos de CPVT i MSC en diverses famílies. Mutacions en aquest gen van mostrar un patró d'herència autosòmica dominant.<sup>40,41</sup>

## Introducció

Poc temps després Lahat i col·laboradors (2001) van descriure el primer cas de CPVT autosòmic recessiu associat al locus 1p13-21.<sup>42</sup> L'any 2004, aquests mateixos autors van associar aquest cas amb mutacions al gen de la calsequestrina 2 (*CASQ2*).<sup>43</sup>

El 2007 Bhuiyan i col·laboradors van identificar el locus 7p14-22 com a causant de la CPVT en una família de 4 individus. Tot i determinar el patró d'herència autosòmica dominant, no es va identificar cap gen dins aquest locus que es pugui associar a CPVT.<sup>44</sup>

Nyegaard i col·laboradors l'any 2012 van associar el locus 14q31-32 com a causant de casos severes de CPVT amb herència autosòmica dominant en una família Sueca. L'anàlisi d'aquesta regió en aquests individus va determinar que una mutació al gen de la calmodulina 1 (*CALM1*) era la causant del CPVT en aquesta família.<sup>45</sup> Aquests investigadors van obrir la porta a què mutacions en els gens que codifiquen per la calmodulina 2 i 3 (*CALM2*, *CALM3*) puguin també causar CPVT. Poc temps després Gómez-Hurtado i col·laboradors (2016) van identificar una mutació a *CALM3* en un pacient diagnosticat amb CPVT i amb genètica negativa en *RYR2* i *CASQ2*.<sup>46</sup> Fins al moment, no s'han identificat mutacions en *CALM2* que causin CPVT. Algunes de les mutacions descrites per *CALM2* estan associades a Síndrome de QT llarg amb cert solapament amb CPVT.<sup>47,48</sup>

L'any 2015 Rooryck i col·laboradors van descriure casos de CPVT en una família associats a dues mutacions trobades a triadina (*TRDN*). Aquesta mutació presentava herència autosòmica recessiva.<sup>49</sup>

Més recentment, s'ha associat una mutació al gen que codifica per *trans-2,3-enoyl-CoA reductase-like* (*TECRL*) com a responsable de casos de CPVT amb patró d'herència autosòmic recessiu.<sup>50</sup>

De tots els gens associats a CPVT, un 50-60% dels casos diagnosticats estan associats a mutacions al gen *RYR2* (CPVT 1). Les mutacions associades a *CASQ2* (CPVT2) representen un 1% dels casos. Els casos associats al locus 7p14-p22 (CPVT 3), *CALM1-3* (CPVT 4) i *TRDN* (CPVT 5) representen cada un menys de l'1% dels casos diagnosticats. Tot i així, queden molts casos de CPVT als quals no es troba una causa genètica.<sup>34</sup>



## Introducció

Actualment, s'estan associant altres gens com a causants d'arrítmies ventriculars induïdes per estrès com el *KCNJ2*, *PKP2*, *SCN5A* i *ANK2*. L'evidència no és del tot clara, ja que mutacions o canvis d'expressió en aquests gens poden mimetitzar el fenotip de la CPVT.<sup>35,51,52</sup> Consens d'experts han reavaluat recentment l'etiologia genètica de la CPVT en un marc estandarditzat, basat en l'evidència, per examinar les relacions gen-malaltia reportades fins al moment. Segons aquest report, només quatre gens arriben a un nivell d'evidència definitiu: *RYR2*, *CASQ2*, *TRDN* i *TECL1*.<sup>51</sup>

### 3.3. Tractament de la CPVT

El tractament més estès per evitar que les arrítmies ventriculars puguin causar la MSC dels pacients amb CPVT són els  $\beta$ -bloquejants com el nadolol. Aquests fàrmacs bloquegen l'acció de les catecolamines alliberades en situacions d'estrès evitant que es puguin desencadenar arrítmies ventriculars. Aquest tractament necessita un estudi de dosi per cada pacient, ja que si la dosi no és la indicada es podran desencadenar igualment arrítmies ventriculars. Aquest tractament és efectiu tot i que en un 25-30% dels casos s'han pogut registrar arrítmies malignes fent un seguiment de 5 anys. El tractament amb  $\beta$ -bloquejants està indicat tant en pacients simptomàtics com asimptomàtics portadors de mutació associada a la CPVT.

Additional als  $\beta$ -bloquejants també es subministra la flecainida, que té un efecte dual. Inhibeix parcialment l'entrada de  $\text{Na}^+$  a través del canal de  $\text{Na}^+$  cardíac  $\text{Nav}1.5$  durant el PAC i també inhibeix parcialment la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del RYR2 en el CICR. La combinació dels  $\beta$ -bloquejants i la flecainida ha mostrat una eficàcia del 95% tant en nens com en adults.

Tot i l'efectivitat dels tractaments farmacològics, hi ha pacients que tot i administrar-los la dosi correcta poden continuar patint síncope i MSC. En aquests casos es recomana la combinació de tractament farmacològic i un desfibril·lador automàtic implantable (DAI). S'ha de tenir present, però, que si el DAI emet una descàrrega pot causar una alliberació de catecolamines que pot induir l'aparició d'arrítmies ventriculars. També s'ha demostrat que les descàrregues dels DAI no són efectives contra les TVB ni contra les TVP. Per aquest motiu es recomana que si s'ha d'implantar un DAI en un pacient de CPVT es tingui en compte els temps de detecció.

## Introducció

Un altre tractament, també invasiu però efectiu, és la denervació simpàtica esquerra. Aquest tractament atenua l'efecte de les catecolamines al cor, disminuint la probabilitat de què es generin arrítmies ventriculars malignes en situacions d'estrès en un 70% dels casos. Aquesta tècnica és molt invasiva i només es recomana en pacients en els quals els tractaments amb  $\beta$ -bloquejants estan contraindicats o no són efectius, i en casos on el pacient està sota tractament farmacològic i porta un DAI i tot i així se li generen arrítmies ventriculars.<sup>35,36,52,53</sup>

### 3.4. Expressivitat variable i penetrància incompleta

Les canalopaties cardíques presenten penetrància incompleta, expressivitat variable i solapament de fenotips. Això significa que individus amb genotip positiu per una mutació i amb el mateix llinatge genètic poden presentar fenotips molt diferents de la malaltia. Per definició, la penetrància d'una malaltia representa la probabilitat que individus portadors de la mateixa mutació manifestin les característiques fenotípiques de la malaltia. Pel contrari, l'expressivitat variable és la severitat amb la qual s'expressarà el fenotip de la malaltia. El fet que dos pacients amb la mateixa mutació puguin o no presentar fenotip i en diferents graus de severitat suggereix que el patrimoni genètic i els factors ambientals poden influenciar en la manifestació del fenotip.<sup>54</sup>

Bauce i col·laboradors (2002) van fer el seguiment de 81 individus que formaven part de 8 famílies diferents identificades per casos de MSC en situacions d'estrès en individus joves. L'anàlisi genètic va revelar la presència de 6 mutacions diferents al gen *RYR2* en aquestes famílies i es van identificar 43 portadors. Les mutacions trobades es localitzaven en regions conservades de *RYR2*, principalment en la regió citosòlica de la proteïna. Les mutacions van presentar entre un 25 i un 100% de penetrància en els individus, i una alta variabilitat en l'expressió dels símptomes dels individus afectats.<sup>55</sup>

Anys després Haugaa i col·laboradors (2010), van analitzar una cohort de 128 pacients en la qual van poder identificar sis individus portadors de mutacions en *RYR2*. L'anàlisi genètic va continuar amb els familiars dels individus portadors de mutacions a *RYR2*. Gràcies a aquest estudi es van identificar en les sis famílies a 30 portadors més de mutacions en *RYR2*, 23 dels quals van presentar arrítmies ventriculars en proves

## Introducció

d'esforç. Aquests investigadors van determinar que la penetrància de les mutacions identificades era del 77%.<sup>56</sup>

L'any 2012 Van der Werf i col·laboradors van fer el seguiment de 116 individus de 15 famílies, portadors de mutacions associades a CPVT i altres possiblement patogèniques al gen *RYR2*. La primera avaluació que van fer dels pacients va determinar que la penetrància era del 50%. Una segona avaluació dels pacients que no havien presentat símptomes en la primera, va mostrar que el nombre d'afectats per simptomatologia de CPVT augmentava. Elevant la penetrància al 63%. Les mutacions trobades es localitzaven a les tres regions de *RYR2*: domini N-terminal, regió central i regió C-terminal. L'avaluació de la implicació de la localització de la mutació en els dominis de *RYR2* va mostrar que no hi havia relació entre la localització de la mutació i el fenotip dels pacients. Tot i així els autors confirmen que mutacions en tots els dominis de *RYR2* provoquen un guany de funció, però que la localització de la mutació pot determinar el grau de l'arrítmia ventricular.<sup>57</sup> Tester i col·laboradors (2007), van determinar que l'efecte de mutacions en *RYR2* responsables de síndrome de la mort sobtada en l'infant afectaven de diferent forma la funció de *RYR2* segons la regió en la qual es localitzaven. Una mutació en la regió central (*RYR2\_p.R2267H*) mostrava un gran augment de la seva activitat en resposta a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. En canvi, la mutació de la regió C-terminal (*RYR2\_p.S4565R*) provocava que el canal tingués una fuga crònica ja en condicions basals i aquesta podia augmentar en situacions d'estrès.<sup>58</sup>

Encara existeix el dubte de per què la mateixa mutació en diferents individus pot presentar una penetrància i expressivitat diferents. En aquest punt entren en joc el patrimoni genètic de cada individu i els factors ambientals, que són essencials per modular la penetrància de la mutació i així acabar modificant el fenotip del pacient.<sup>59</sup>

### 3.5. Mecanisme de generació d'arrítmies en la CPVT

Les arrítmies que causen la MSC en la CPVT són atribuïdes a mutacions a diferents gens associats a la regulació de l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular. Les mutacions que generen un guany de funció al *RYR2* s'ha descrit que indueixen la desestabilització del canal, causant sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  durant la diàstole. Aquestes promouen l'activació de l'intercanviador NCX que genera un corrent entrant de  $\text{Na}^+$  que podrà iniciar un nou

## Introducció

PAC en diàstole el que s'anomena *triggered activity* o activitat desencadenada. Això, provoca l'aparició de *delayed afterdepolarization* o post-despolaritzacions tardanes (DAD) que podran promoure la generació de les TVB i TVP que podrien desencadenar la MSC als pacients.<sup>60</sup>

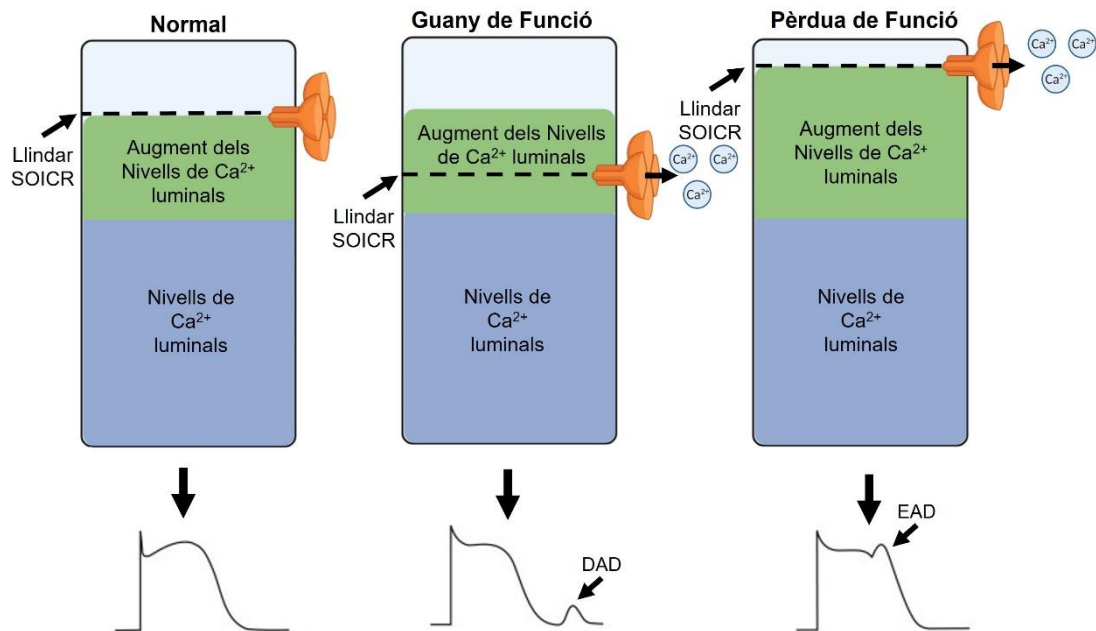
La caracterització del model de ratolí *knock in* per RYR2\_p.R4496C<sup>+/-</sup>, mutació que indueix un guany de funció al RYR2, realitzada per Liu i col·laboradors (2006) va mostrar que en un 63% dels miòcits aïllats de ratolí RYR2\_p.R4996C<sup>+/-</sup> es va observar la presència de DADs i en un 12% activitat desencadenada. En canvi, en els miòcits dels animals WT no es van observar aquests fenòmens. L'exposició dels miòcits aïllats a isoproterenol va mostrar que un 45% dels miòcits WT analitzats mostraven DADs però no activitat desencadenada. La incidència de DADs i activitat desencadenada va augmentar fins al 87% de miòcits RYR2\_p.R4996C<sup>+/-</sup> analitzats. L'augment de la freqüència de DADs i d'activitat desencadenada durant l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, va mostrar que l'activació d'aquesta via és necessària per empitjorar les anormalitats existents en la funció dels RYR2 mutats.<sup>61</sup> Aquesta mateixa mutació va ser estudiada en el model d'expressió heteròloga HEK-293T, en el qual es va observar que l'augment de sortides espontànies de Ca<sup>2+</sup> eren donades per una disminució del llindar del SOICR causat per aquesta mutació (Figura 8 Centre).<sup>62</sup>

Aquest mecanisme només explica com mutacions del RYR2 que indueixen un guany de funció poden generar arrítmies letals, per tant, no serviria per explicar com mutacions que generen una pèrdua de funció en el RYR2 poden generar també arrítmies ventriculars letals.

Estudis realitzats amb models d'expressió heteròloga han revelat que mutacions que generen una pèrdua de funció augmenten el llindar per a la generació SOICR.<sup>63</sup> Zhao i col·laboradors (2015) van expressar el RYR2\_p.A4860G per determinar l'efecte de la mutació en HEK-293T. Aquests investigadors van determinar que la probabilitat d'obertura ( $P_o$ ), temps que el canal es troba en estat obert respecte al temps total d'observació, del canal era extremadament inferior al RYR2 WT indicant una pèrdua de funció significativa del canal. Aquests mateixos investigadors van generar un model de ratolí *knock in* per RYR2\_p.A4860G<sup>+/-</sup>. Aquest model va mostrar que el guany de l'acoblament E-C era menor en els ratolins RYR2\_p.A4860G<sup>+/-</sup> degut a una menor

## Introducció

alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  per part del RYR2 induïda per l'activació dels LTCC. Els PAC mostraven una durada global més alta comparada amb els WT, associat a un augment de la durada de la fase d'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fase de *plateau* del PAC. Això provocava un augment del corrent generat per NCX, el qual seria el responsable de la generació del post-despolaritzacions tempranes (EADs) durant la fase de *plateau* o de repolarització. En estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, es produeix un augment de la càrrega del reticle sarcoplasmàtic degut a la disminució del  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat en la sistole. La sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic augmentarà la durada de la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic, i per tant augmentarà la freqüència de EADs que podran derivar en arrítmies mortals (Figura 8 Dreta).<sup>64</sup>



**Figura 8. Mecanisme de generació d'arrítmies ventriculars per a mutacions amb guany i pèrdua de funció en el RYR2 associades a la CPVT.** Es mostren representacions esquemàtiques del reticle sarcoplasmàtic i els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals. A l'esquerra es mostra com en condicions normals no es donen sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  i com el PAC és normal. Al centre es mostra com el llindar del SOICR disminueix en els RYR2 amb mutacions que indueixen el guany de funció, induint sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  que promouran l'aparició de DADs en diàstole. A la dreta s'observa com mutacions que indueixen pèrdua de funció provoquen un augment del llindar del SOICR. L'augment del llindar del SOICR més la sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic augmentarà la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  en sistole generant EADs. Creada amb Biorender.

## Introducció

Aquests dos mecanismes explicarien com mutacions en el RYR2 que generen guany o pèrdua de funció poden generar fenòmens arritmogènics com els DADs i EADs en els miòcits cardíacs. Noves evidències suggereixen que les fibres de Purkinje podrien tenir també un paper en la generació de les arrítmies ventriculars.

Les cèl·lules de Purkinje són cèl·lules del sistema de conducció del cor especialitzades en la ràpida propagació del PAC. S'ha vist que aquestes cèl·lules tenen una major sensibilitat a l'aritmogènesis en condicions de sobrecàrrega de  $\text{Ca}^{2+}$ , presentant una major incidència de DADs i de EADs comparat amb els miòcits ventriculars. Willis i col·laboradors (2016) van realitzar un estudi amb el model de ratolí *knock in* per la mutació RYR2\_p.R4496C<sup>+/-</sup> per estudiar l'efecte de la mutació en miòcits ventriculars i en les cèl·lules de Purkinje. Aquest estudi va determinar 3 fets importants: (1) l'activitat desencadenada es donava a les cèl·lules de Purkinje del sistema de conducció. (2) Van demostrar que les cèl·lules de Purkinje tenien un llindar inferior per a la generació de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$ . (3) Les cèl·lules de Purkinje tenen una major sensibilitat per generar activitat desencadenada, DADs i EADs comparat amb els miòcits ventriculars tant en estat basal com en estrès  $\beta$ -adrenèrgic. Finalment, aquest estudi va concloure que l'augment de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  i el nivell de  $\text{Na}^+$  intracel·lular més elevat que presenten les cèl·lules de Purkinje dels ratolins RYR2\_p.R4496C<sup>+/-</sup>, promouen l'activitat desencadenada i l'activitat arritmogènica a menors nivells d'estrès.<sup>65</sup>

Els EADs i els DADs explicarien l'aparició d'arrítmies letals tant en mutacions que generen una pèrdua com un guany de funció al RYR2. Tot i així també s'ha de tenir en compte els efectes d'aquestes mutacions sobre el sistema de conducció al cor, ja que les cèl·lules de Purkinje mostren una major susceptibilitat a generar arrítmies que els cardiomiòcits ventriculars.

## 4. El receptor de rianodina de tipus 2

### 4.1. Propietats biofísiques del RYR2

La localització del RYR2 en el reticle sarcoplasmàtic dificulta l'estudi de les seves propietats biofísiques utilitzant la tècnica del *patch clamp*, com és el cas dels canals localitzats a la membrana dels miòcits cardíacs. Per aquest motiu les propietats biofísiques del RYR2 s'han estudiat mitjançant la inclusió del canal en bicapes lipídiques. Aquests estudis han permès estudiar la permeabilitat d'aquest canal per diferents ions i

## Introducció

determinar com els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  tant citosòlics com luminals modulen la funció del canal.

Els RYRs són canals iònics amb una major conductància pels cations monovalents com el  $\text{K}^+$  (~750pS en presència de 0.25 M de  $\text{K}^+$ ), comparat amb la conductància que presenten pels ions divalents com el  $\text{Ca}^{2+}$  (~150pS en presència de 50 mM de  $\text{Ca}^{2+}$ ). Els RYRs presenten una àmplia selectivitat per cations monovalents com pel  $\text{K}^+$ ,  $\text{Li}^+$  i  $\text{Na}^+$  i pels cations divalents com pel  $\text{Ba}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Sr}^{2+}$ , però en condicions fisiològiques els cations divalents com el  $\text{Ca}^{2+}$  són seleccionats per sobre dels cations monovalents.<sup>66</sup> Estudis realitzats en bicapes lipídiques van donar moltes evidències de la regulació de l'obertura del RYR2 per  $\text{Ca}^{2+}$  mesurant la  $P_o$  del RYRs en diferents concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estudis de canal únic van mostrar que la  $P_o$  dels RYRs és dependent tant del  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic com del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. En concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic properes a les presents en un miòcit en diàstole (aproximadament 0.8  $\mu\text{M}$ ), la  $P_o$  dels RYR2 és propera a zero. Quan augmenta la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cara citosòlica del RYR2 (com quan es produeix l'obertura dels LTCC en el PAC) i la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  arriba al voltant dels 11  $\mu\text{M}$  augmenta la  $P_o$  dels RYR2. Concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  en el rang milimolar tenen l'efecte contrari, disminueixen la  $P_o$  de RYR2. En el cas del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, concentracions elevades augmenten la  $P_o$  del canal però, en canvi, concentracions baixes de  $\text{Ca}^{2+}$  inhibeixen l'obertura del RYR2.<sup>67-69</sup>

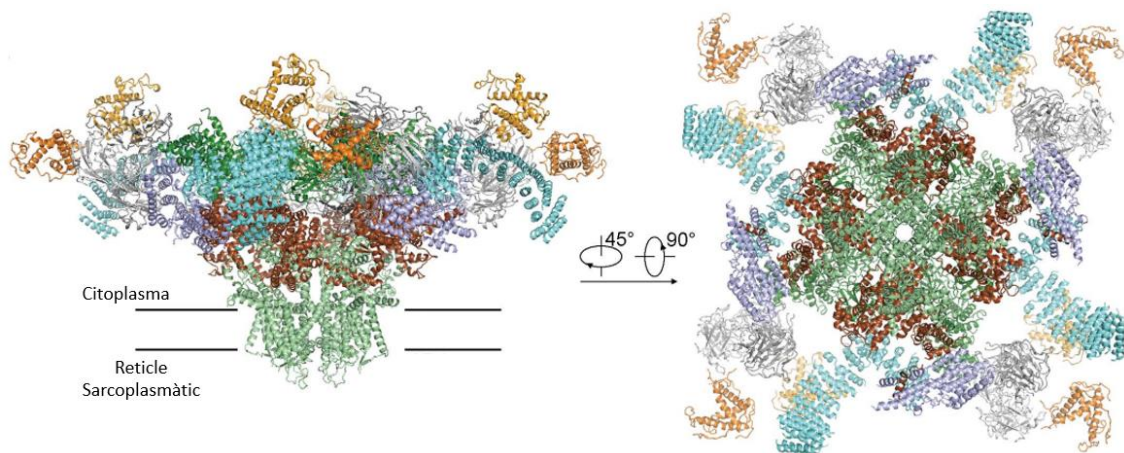
### 4.2. Estructura del gen i la proteïna RYR2

El gen *RYR2* està format per 105 exons, aproximadament 709 Kb. Aquest gen codifica per la proteïna RYR2, formada per 4.967 aminoàcids i amb un pes molecular aproximat de 565 KDa. El canal funcional és un tetràmer format per 4 subunitats idèntiques.<sup>70</sup> Els RYR2 són els canals iònics més grans coneguts, ja que l'homotetràmer supera els 2 MDa de pes molecular. Cada una de les subunitats dels RYR2 està format per tres regions diferenciades: la regió citoplasmàtica formada per més de 4500 aminoàcids, la regió transmembrana (formada per 6 segments hèlix  $\alpha$ ) i la regió C-terminal (Figura 9). Cada una de les regions dels RYRs té un paper funcional diferent. La regió citoplasmàtica serveix d'unió a lligands i conté llocs d'unió per a proteïnes moduladores. La regió transmembrana és la que formarà el porus del canal, per on premeran els ions.<sup>70,71</sup> La

## Introducció

regió C-terminal, a part d'estabilitzar el porus del canal, també serveix d'unió de diferents lligands com el  $\text{Ca}^{2+}$ , l'ATP i la cafeïna.<sup>72</sup>

El RYR2 comparteix un 70% de la seqüència, la seva arquitectura i organització dels dominis amb el receptor de rianodina predominant en múscul esquelètic el RYR1.<sup>71</sup> L'estructura de RYR1 va ser determinada a una resolució de 3.8 Å per Yan i col·laboradors (2015), i té aparença de piràmide amb una base de 270 Å per 270 Å i una altura de 160 Å (Figura 8). Un total de nou dominis van ser observats a la regió citoplasmàtica de cada una de les subunitats que formen el tetràmer (Figura 9).<sup>73</sup>



**Figura 9. Estructura del RYR2.** Estructura del RYR2 en estat tancat. Modificada de Peng i col·laboradors (2016).<sup>71</sup>

Dels nou dominis identificats en la regió citoplasmàtica, únicament ens centrarem en el paper regulador del domini N-terminal del RYR2. Ja que és el domini que conté la mutació que s'estudiarà en aquesta tesi la RYR2\_p.G357S.

L'estructura del domini N-terminal del RYR1 va ser resolta amb una resolució de 2.5Å per Tung i col·laboradors (2010). El domini N-terminal es troba localitzat a la regió citoplasmàtica del canal formant un vestíbul al voltant dels 4 eixos que es troben a la regió central del canal. Aquest està format per tres subdominis: A (residus 1-205), B (residus 206-394) i C (residus 395-532) (Figura 10). Tant el subdomini A com el subdomini B estan formats per làmines  $\beta$  a diferència del subdomini C que està format per 5 hèlixs  $\alpha$ . La resolució de l'estructura del domini N-terminal va revelar interaccions a nivell estructural entre els subdominis A, B i C. La majoria de mutacions localitzades en aquest domini es troben en les regions d'interacció entre els subdominis A i C. Mutacions en el



## Introducció

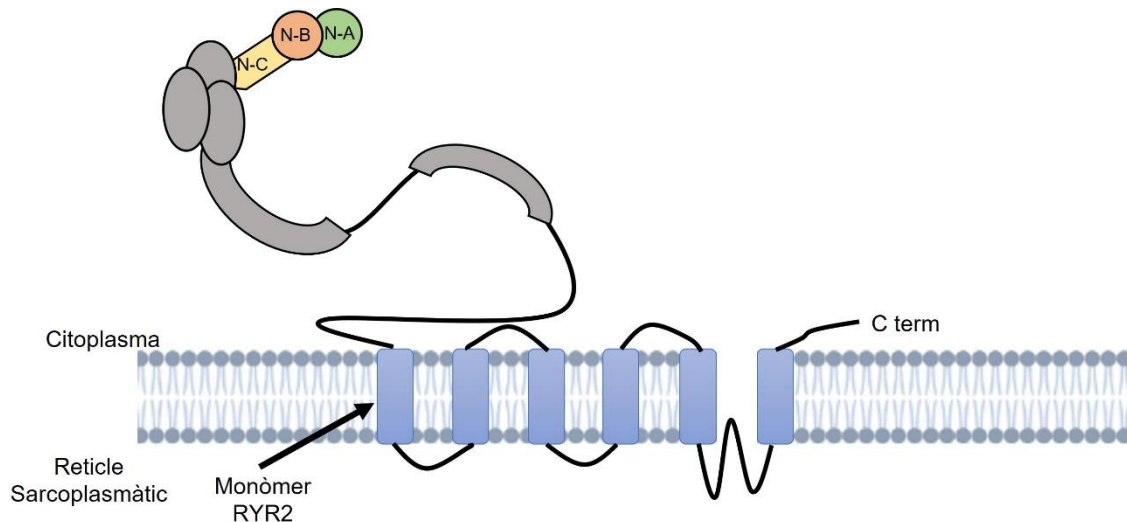
domini N-terminal desestabilitzen les interaccions entre aquests subdominis, alterant la conformació del domini el qual és important per a la regulació tant de l'obertura com del tancament del canal.<sup>74</sup>

El paper a nivell funcional dels subdominis A, B i C del domini N-terminal en el RYR2 va ser determinada per Liu i col·laboradors (2015), els quals van fer delecions selectives de cada un d'aquests subdominis. La delecio del subdomini A, va mostrar una reduccio en el llindar de  $\text{Ca}^{2+}$  necessari per a la terminacio de l'alliberacio de  $\text{Ca}^{2+}$ , mostrant la implicacio d'aquest domini en la terminacio de l'alliberacio del  $\text{Ca}^{2+}$ . La delecio del subdomini B va augmentar significativament la sensibilitat del RYR2 a la cafeina, l'activacio del canal pel  $\text{Ca}^{2+}$  citosolic, va reduir el llindar per a l'activacio del SOICR augmentant la tendencia de mostrar activitat SOICR, i va reduir el llindar per a la terminacio de l'alliberacio de  $\text{Ca}^{2+}$ . Mutacions entre les interaccions dels subdominis A i B mostren un augment en l'activitat del RYR2. Per tant, totes les evidencies en conjunt indiquen que el domini B esta involucrat en la finalitzacio de l'alliberacio de  $\text{Ca}^{2+}$ , ja sigui de forma directa o indirecta via interaccio amb el subdomini A.

La delecio del subdomini C va suprimir l'activacio del RYR2 per la cafeina, i va eliminar l'activacio del SOICR a nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosolics mostrant que el subdomini C es necessari per a l'activacio del canal.<sup>75</sup>

Les delecions selectives van demostrar que el domini N-terminal es necessari per a la regulacio de l'activacio i la finalitzacio de l'alliberacio de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmatic durant el CICR.

## Introducció

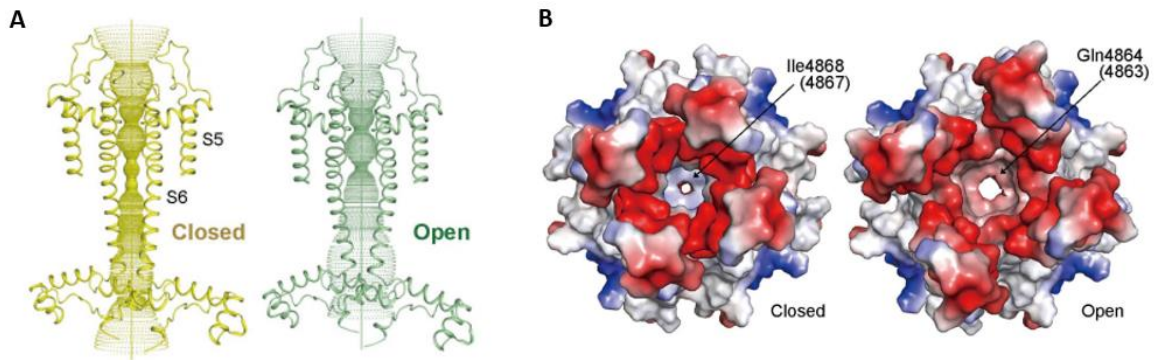


**Figura 10. Estructura d'un monòmer de RYR2.** Esquema representatiu de la regió citosòlica d'un monòmer de RYR2. N-C, subdomini C del domini N-terminal; N-B, subdomini B del domini N-terminal; N-A, subdomini A del domini N-terminal.

### 4.2.1. Canvis conformacionals que indueixen l'obertura del RYR2

Peng i col·laboradors (2016) van poder determinar l'estructura de RYR2 en estat obert amb una resolució de 4.4Å (en presència de 20 µM de Ca<sup>2+</sup> i 2,2',3,5',6-pentaclorobipfenil) i en estat tancat amb una resolució de 4.2Å (en presència de 5 mM d'àcid etilendiaminotetraacètic, EDTA). L'obtenció de les dues estructures va permetre determinar els canvis conformacionals que es donaven per a la transició d'estat tancat a obert. Comparant les dues estructures, es va veure que no es donaven grans canvis estructurals als dominis citoplasmàtics. Si no que el moviment global es donava per la rotació i desplaçament dels dominis de la regió citoplasmàtica. El domini central va ser identificat com el primer transductor dels canvis conformacionals, controlant l'obertura i el tancament del canal. Aquest domini pateix tant una contracció intradomini com una rotació, que provoca la inclinació cap a l'exterior dels segments S6 que formen el porus (Figura 11A). La desviació del porus per generar l'obertura començava en la F4854 promovent la flexió dels segments S6 cap a l'exterior causant la dilatació de la comporta intracel·lular fins a uns 8Å. Aquest canvi genera un desplaçament del lloc de constricció del porus de I4868 a Q4864 (Figura 11B). Els quatre residus Q4864 dels quatre protòmers provoquen una constricció de fins a 4Å en aquesta regió, per permetre el pas dels ions Ca<sup>2+</sup> d'un en un.<sup>71,76</sup>

## Introducció



**Figura 11. Canvis conformacionals del RYR2 per l'obertura.** A. Representació d'un tall sagital del RYR2 on es mostra l'obertura del porus del canal. B. Obertura del porus observada des de la part superior del RYR2. Modificada de Peng i col·laboradors (2016).<sup>71</sup>

### 4.3. Activació del RYR2 per lligands endògens i exògens

#### 4.3.1. Lligands endògens

L'obertura del RYR2 es troba regulada tant per proteïnes moduladores, com s'explicarà més endavant, com per lligands endògens com el  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  o ATP. També es coneixen lligands exògens que han estat utilitzats per realitzar estudis farmacològics per estudiar les característiques biofísiques del canal com la cafeïna i la rianodina.

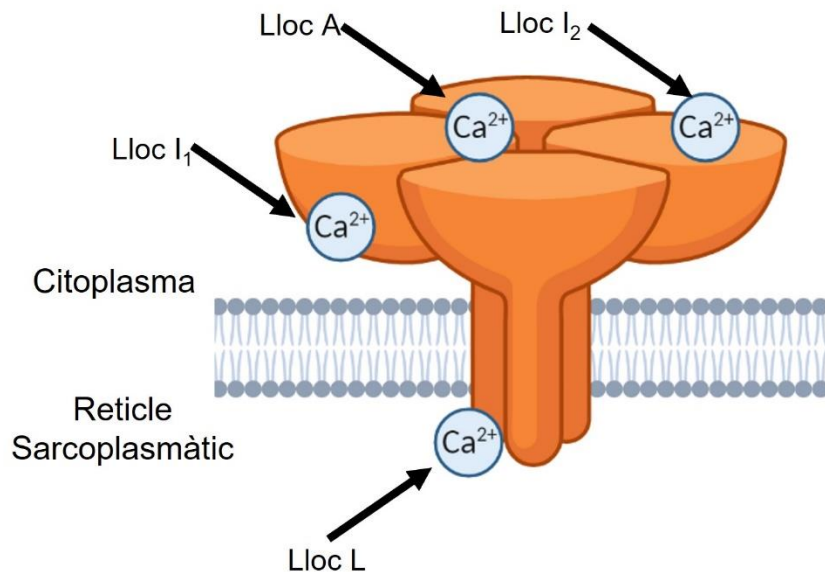
El  $\text{Ca}^{2+}$  és un dels principals lligands endògens del RYR2. La regulació dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  tant a la cara citoplasmàtica com a la luminal del RYR2 és complexa. Un augment de la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  a la cara citoplasmàtica al voltant dels  $10 \mu\text{M}$  indueix l'obertura del RYR2 i, per tant, la sortida de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle. Quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  arriba al voltant de  $10 \text{mM}$  a la regió citosòlica, el RYR2 s'inactiva. Aquesta capacitat del  $\text{Ca}^{2+}$  per regular tant l'obertura com la inactivació del canal depenent dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  a les dues cares del canal va portar a pensar en la presència de diversos llocs d'unió de  $\text{Ca}^{2+}$  en el RYR2. S'han proposat tres llocs d'unió citoplasmàtics (Lloc A, lloc  $I_1$  i lloc  $I_2$ ) i un lloc d'unió luminal (Lloc L) que regulen l'activació i la inhibició de RYR2 pel  $\text{Ca}^{2+}$  (Figura 12).<sup>77,78</sup>

Els RYRs poden ser activats per la unió de  $\text{Ca}^{2+}$  a un lloc localitzat a la regió citoplasmàtica (Lloc A) o a un lloc de la regió luminal (Lloc L). El lloc A té alta afinitat per la unió de  $\text{Ca}^{2+}$ , aproximadament  $1 \mu\text{M}$ , i estructuralment està format per les cadenes laterals dels aminoàcids E3893-E3967 a una distància de  $9 \text{nm}$  del porus del canal. Els aminoàcids que conformen el lloc L encara no han estat determinats, però es creu que aquest es

## Introducció

localitzen a la regió del segment S6. Aquest lloc presenta una afinitat pel  $\text{Ca}^{2+}$  molt més elevada que el lloc A, aproximadament de  $40 \mu\text{M}$ . Aquests dos dominis presenten sinergia entre ells, l'elevació del  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic de 1 a  $100 \text{ nM}$  augmenta 4 vegades l'activació per  $\text{Ca}^{2+}$  luminal sense alterar l'afinitat del lloc L. El mateix passa amb l'augment del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal fins a  $0.1 \text{ mM}$ , que augmenta l'activació per  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic sense alterar l'afinitat del lloc A. Delecions dels llocs A o L causen la pèrdua parcial en l'activació, mostrant la sinergia entre aquests dos dominis.

En el RYR1 la  $P_o$  disminueix notablement quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic arriba a  $100 \mu\text{M}$ , indicant la presència d'un lloc inhibidor de baixa afinitat. Aquest lloc s'ha anomenat lloc  $I_1$ . La localització concreta d'aquest domini encara no es coneix, però es creu que podria estar localitzat entre els aminoàcids 1873-1903. Un altre lloc d'inhibició, però d'alta afinitat ha estat identificat en els RYRs, el lloc  $I_2$ . Aquest lloc redueix la  $P_o$  del canal en concentracions submicromolars de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic. La localització d'aquest domini encara no es coneix, però es creu que es localitza a uns  $26 \text{ nm}$  de la boca citoplasmàtica del canal.<sup>79</sup>



**Figura 12. Llocs d'unió del  $\text{Ca}^{2+}$  al RYR2.** Es mostren els llocs d'activació de RYR2 per  $\text{Ca}^{2+}$  a nivell citoplasmàtic (Lloc A) i luminal (Lloc L) i dels llocs d'inhibició de l'activitat de RYR2 per  $\text{Ca}^{2+}$  (Lloc  $I_1$  i  $I_2$ ). Creada amb Biorender.

El  $\text{Mg}^{2+}$  i l'ATP també són moduladors endògens de l'activitat de RYR2. El  $\text{Mg}^{2+}$  és un inhibidor dels RYRs i actua com a competidor del  $\text{Ca}^{2+}$ , sent antagonista al lloc A. La unió

## Introducció

del  $Mg^{2+}$  al lloc A no només evita l'activació per  $Ca^{2+}$ , sinó que també pot tancar els canals que s'activin per  $Ca^{2+}$  luminal.<sup>80</sup> En canvi, l'ATP és un potent activador dels RYRs que a concentracions milimolars millora l'activació dependent de  $Ca^{2+}$  augmentant la  $P_o$  dels canals inclús en nivells de  $Ca^{2+}$  diastòlics.<sup>81</sup>

### 4.3.2. Lligands exògens

La rianodina és un alcaloide amb propietats d'insecticida. Aquest compost presenta afinitat pels RYRs quan es troben en estat obert, però la seva acció sobre el canal és concentració-dependent podent augmentar o disminuir la permeabilitat de la membrana del reticle sarcoplasmàtic modificant la funció dels RYRs. La rianodina en concentracions inferiors a nanomolar pot estimular i incrementar la  $P_o$  del RYR2. En concentracions dins el rang nanomolar indueix estats de subconductància en els RYRs. En canvi, l'addició de concentracions elevades en el rang de micromolar produeix la inhibició permanent del canal.<sup>82</sup>

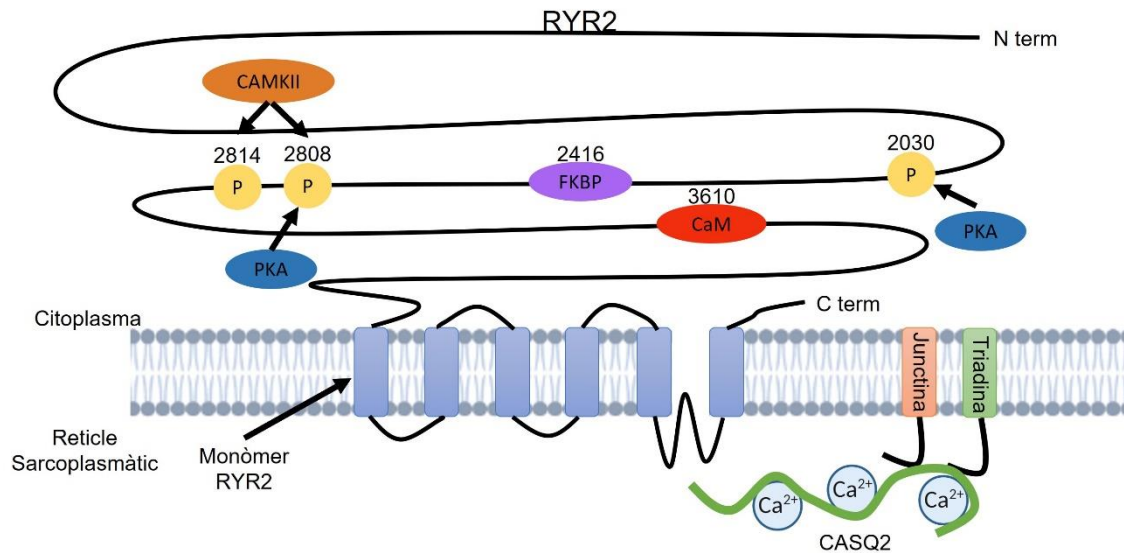
Un altre dels lligands exògens que té un paper molt important per a l'estudi de la funció dels RYRs és la cafeïna. La cafeïna és una metilxantina natural molt utilitzada per a augmentar la  $P_o$  dels RYRs. L'addició de concentracions baixes de cafeïna promou l'obertura dels RYRs modulant la sensibilitat dels RYRs al  $Ca^{2+}$  citoplasmàtic, mentre que altes concentracions de cafeïna augmenten la sensibilitat al  $Ca^{2+}$  luminal.<sup>82</sup> L'addició de múltiples concentracions submàximes poden induir una alliberació de  $Ca^{2+}$  transitòria i parcial a través dels RYRs. L'augment de fracció de  $Ca^{2+}$  alliberada és el resultat de l'activació seqüencial de diferents poblacions de RYRs en una mateixa cèl·lula. Tot i aquesta capacitat adaptativa dels RYRs respecte a les concentracions creixents de cafeïna, aquesta resposta es veu íntimament lligada a la concentració de  $Ca^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic: si la concentració és baixa no es podrà induir la sortida de  $Ca^{2+}$  del reticle per cafeïna.<sup>83</sup> L'aplicació de concentracions creixents de cafeïna i la mesura del  $Ca^{2+}$  alliberat a cada concentració s'utilitza com a mesura per determinar la funció dels RYRs.<sup>84</sup>

### 4.4. RYR2 i el seu complex macromolecular

El RYR2 interacciona amb una multitud de proteïnes accessòries formant un complex macromolecular que regula l'alliberació de  $Ca^{2+}$ . A nivell de reticle sarcoplasmàtic, al

## Introducció

costat intraluminal, el RYR2 interacciona principalment amb la junctina, la triadina i la calseqüestrina 2. A nivell de citoplasma interacciona amb la calmodulina i FKBP12.6. El RYR2 també és substrat de les quinases PKA i la quinasa dependent de calmodulina II (CAMKII) (Figura 13). A continuació s'explicarà el paper d'aquestes proteïnes en la regulació de l'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  a través de RYR2.



**Figura 13. Complex macromolecular del RYR2.** Representació esquemàtica de les proteïnes que interaccionen i regulen el RYR2. RYR2, receptor de rianodina tipus 2; CAMKII, quinasa dependent de calmodulina II; FKBP, proteïna d'unió FKBP12.6; PKA, proteïna quinasa A; P, fosforilació; CaM, Calmodulina; CASQ2, calseqüestrina 2.

### 4.4.1. Interacció calseqüestrina 2, junctina i triadina

La calseqüestrina 2 (CASQ2) és una proteïna localitzada al lumen del reticle sarcoplasmàtic i actua com a tampó dels ions  $\text{Ca}^{2+}$  (40-50 mmol  $\text{Ca}^{2+}$ /mol CASQ2). La unió de  $\text{Ca}^{2+}$  a la CASQ2 induïx un canvi conformacional a la proteïna que promou la seva polimerització, generant uns filaments altament compactats que augmenten la capacitat d'emmagatzematge de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquest efecte és reversible, per tant, quan els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic són baixos es donarà l'efecte contrari de despolimerització de la CASQ2. Aquesta interacciona amb la triadina i la junctina, a través del seu domini C-terminal, formant un complex conjuntament amb el RYR2 (Figura 13). Aquest complex localitza els reservoris de  $\text{Ca}^{2+}$  a regions properes als RYR2. Això permetrà que es produeixi l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  de forma immediata durant l'acoblament E-C.<sup>85,86</sup>

## Introducció

En el model *knock out* de CASQ2 generat per Knollman i col·laboradors (2006) es va observar que en condicions d'estrès es produeixen alliberacions espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del RYR2, simulant el fenotip arritmogènic observat en casos de CPVT. Un altre dels efectes de la pèrdua de CASQ2 era la disminució de capacitat d'emmagatzematge de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic. Fins abans de la generació del model *knock out*, es pensava que la CASQ2 actuava com a sensor del  $\text{Ca}^{2+}$  luminal pel RYR2. Aquest model ha demostrat que la CASQ2 no actua com a sensor, sinó que el RYR2 també pot actuar com a sensor dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal.<sup>87</sup> Més recentment, s'ha demostrat que la CASQ2 té un paper en la regulació de l'activació i la inhibició del RYR2. Ja que a concentracions elevades de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic ( $\geq 250 \mu\text{M}$ ) la CASQ2 és capaç d'activar el RYR2. En canvi, quan les concentracions són baixes ( $\leq 20 \mu\text{M}$ ), té un efecte inhibitor sobre el canal.<sup>86</sup> Aquests estudis mostren que CASQ2 és important per al correcte funcionament del RYR2.

La junctina i la triadina són dues proteïnes incloses en la membrana del reticle sarcoplasmàtic que serveixen d'ancoratge per a la localització de CASQ2 propera al RYR2. A part de funció d'ancoratge, aquestes proteïnes han mostrat tenir altres funcions dins el complex macromolecular del RYR2. Modificacions en els nivells d'expressió de junctina s'ha vist que modifica l'amplitud dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  allargant-los o escurçant-los, segons si és sobreexpressada o reprimida, respectivament. També, models *knock out* han mostrat l'aparició de DADs. Tot i que el mecanisme pel qual la junctina modula aquests processos no és conegut, es creu que podria tenir un paper en la regulació de la càrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic i en la modulació de l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  pel RYR2.

La funció de la triadina dins el complex macromolecular del RYR2 no està del tot clara, tot i així, dues possibles opcions estan en discussió. La primera és que la triadina facilita l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic posicionant la CASQ2 propera als RYR2. L'altra opció és que la triadina regula directament l'activitat del RYR2.<sup>88</sup> Estudis de sobreexpressió realitzats per Terentyev i col·laboradors (2005) indicarien que la triadina actuaria directament estimulant el RYR2.<sup>89</sup>

## Introducció

### 4.4.2. Calmodulina

La calmodulina (CaM) actua com a sensor de  $\text{Ca}^{2+}$  cel·lular. El seu paper principal és l'activació de vies de senyalització dependents de  $\text{Ca}^{2+}$ . La CaM està codificada per tres gens diferents: *CALM1*, *CALM2*, *CALM3*, però tots tres gens generen la mateixa proteïna. La CaM presenta dos tipus d'estructures depenent si té o no  $\text{Ca}^{2+}$  unit. Quan no té  $\text{Ca}^{2+}$  unit, apo-CaM, és presenta com una estructura tancada i compacta. La unió de  $\text{Ca}^{2+}$  a CaM ( $\text{Ca}^{2+}$ -CaM), promou un canvi conformacional cap a una estructura més oberta que li permetrà la interacció amb les proteïnes diana.<sup>90</sup>

La CaM regula la  $P_o$  del RYR2 unint-se directament als llocs d'unió (Figura 13), però també pot regular indirectament la funció d'aquest canal activant la CaMKII que fosforila el residu serina (S) 2814 del RYR2. La unió de CaM al RYR2 produeix la inhibició del canal reduint la freqüència de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic. El grau d'inhibició dependrà del nivell de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic. Tot i que les dues formes, apo-CaM i  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM, es puguin unir al RYR2, la forma apo-CaM té un efecte inhibitor major.<sup>91,92</sup> Estudis més recents apunten que la inhibició del RYR2 per CaM és dependent de la fosforilació dels residus S2808 o del S2814 del RYR2. Això faria que en situacions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, la unió de CaM protegeixi contra les sortides aberrants de  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic que podrien induir arrítmies ventriculars mortals.<sup>93</sup>

Algunes mutacions que afecten la inhibició del RYR2 depenent de CaM estan lligades a malalties arritmogèniques com és el cas de la CPVT. Mutacions en CaM mostren un augment de la  $P_o$  del RYR2 a conseqüència de la disminució de l'eficiència d'inhibició de la CaM, augmentant les sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  que podrien derivar en arrítmies ventriculars malignes com en el cas de la CPVT.<sup>46,48</sup>

### 4.4.3. Proteïnes d'unió FK506: FKBP12 i FKBP12.6

De la família de proteïnes d'unió a FK506, les més expressades en els miòcits cardíacs de mamífers són FKBP12 i FKBP12.6. Aquestes dues proteïnes comparteixen un 85% de la seva seqüència i tenen una estructura 3D molt similar. Tenen 4 llocs d'unió per tetràmer de RYR2 (Figura 13), però l'afinitat d'unió de FKBP12.6 per RYR2 és major. Originalment, es pensava que FKBP12.6 era l'únic FKBP que s'unia al RYR2, però s'ha demostrat que tant FKBP12 i FKBP12.6 es poden unir al RYR2. L'abundància en el teixit cardíac de FKBP12.6 és molt menor que la de FKBP12, suggerint que tot i que l'afinitat de FKBP12



## Introducció

és menor, la major quantitat present en els miòcits cardíacs farà que més FKBP12 estigui unit als RYR2. Estudis han mostrat que només un 20% dels RYR2 tenen FKBP12.6 unit.<sup>94,95</sup> En els cas de FKBP12.6, el seu paper regulador del RYR2 s'ha vist en models de sobreexpressió en cardiomiòcits de conill on la freqüència, l'amplitud i la duració dels *sparks* de  $Ca^{2+}$  disminueixen. Al mateix temps, els transitoris de  $Ca^{2+}$  augmentaven d'amplitud per l'augment de la càrrega del reticle sarcoplasmàtic. La sobreexpressió de FKBP12.6 en un model de ratolí va mostrar un efecte protector contra les arrítmies ventriculars. Tot i que no podia ser atribuïble només a l'estabilització del RYR2 perquè es va observar canvis en la corrent  $I_{Ca,L}$  i en l'activitat de l'intecanviador NCX. En un altre model la sobreexpressió de FKBP12 en cardiomiòcits de conill adult va mostrar una reducció del guany de l'acoblament E-C i una menor freqüència dels *sparks* de  $Ca^{2+}$ , suggerint que FKBP12 redueix la sensibilitat del RYR2 cap a  $Ca^{2+}$  citosòlic.<sup>95</sup>

Wehrens i col·laboradors (2003) van generar un model *knock out* per FKBP12.6 i van mostrar la presència d'arrítmies ventriculars i MSC en situacions d'exercici i infusió de catecolamines. Aquest model mostra el paper del FKBP12.6 com a estabilitzador de l'obertura espontània del RYR2, protegint de la possible generació d'arrítmies ventriculars letals.<sup>96</sup> Fins aquell moment es creia que l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica provocava la dissociació del FKBP12.6 unit al RYR2, i per tant l'augment de la  $P_o$ , donat a la fosforilació del RYR2 per la PKA.<sup>97</sup> No obstant això, un estudi realitzat per Xiao i col·laboradors l'any 2004, va demostrar que FKBP12.6 no es dissocia del RYR2 per la fosforilació de PKA al residu S2808, sinó que FKBP12.6 és capaç d'unir-se tant al RYR2 fosforilat com desfosforilat. Això posa en dubte el mecanisme descrit per Marx i col·laboradors (2000).<sup>98</sup> Gonano i col·laboradors (2017) mostren que la localització del lloc d'unió de FKBP12.6 es troba lluny dels llocs de fosforilació S2808 i S2814 ( $>60\text{\AA}$ ), mostrant que la fosforilació d'aquests residus no pot actuar directament sobre la unió de FKBP12.6.<sup>95</sup>

### 4.4.4. PKA i CAMKIIA

La fosforilació del RYR2 té un paper essencial en la regulació del canal en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic. El RYR2 té tres residus fosforilables el S2808, S2814 i S2031, els quals poden ser fosforilats per PKA (S2808 i S2031) o per la CAMKII (S2814 i, amb menor eficiència S2808). Tot i que el principal lloc de fosforilació per PKA és el S2808, més

## Introducció

recentment també s'han identificat dos altres llocs de fosforilació propers, S2811 i treonina (T) 2810. Dels residus T2810 i S2811 no se sap clarament si poden ser fosforilats per PKA, ja que a nivell estructural estarien situats a una regió subòptima per l'acció de PKA.<sup>99</sup>

Tal com ja s'ha explicat anteriorment l'apartat 2.2.5, la quinasa PKA s'activa per l'augment del cAMP donat per l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica. La PKA té com a dianes de fosforilació moltes proteïnes involucrades en l'acoblament E-C. Una de les dianes principals és el RYR2. La fosforilació del RYR2 per PKA juga un paper important en la regulació de la  $P_o$ . La fosforilació del residu S2808 provoca un augment de la sensibilitat del RYR2 pel  $Ca^{2+}$  citosòlic, tal com s'ha demostrat en experiments de bicapes lipídiques, augmentant així la  $P_o$  del RYR2.<sup>97,99</sup>

No obstant aquests resultats, per tal de determinar l'efecte *in vivo* de la fosforilació del residu S2808, s'han generat diversos models animals en els quals se'ls ha induït el canvi RYR2\_p.S2808A, que fa que el residu no sigui fosforilable. En els estudis realitzats per MacDonnell i col·laboradors (2008), no es van observar diferències entre els ratolins WT i els RYR2\_p.S2808A en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, posant en dubte el paper de S2808 com a modificador de la funció del RYR2 en condicions d'estrès.<sup>100</sup> En canvi, l'estudi realitzat per Shan i col·laboradors (2010) va mostrar que la fosforilació del residu S2808 per PKA és essencial per donar resposta fisiològica per l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>101</sup> Estudis més recents realitzats per Ullrich i col·laboradors (2012) donen suport a les evidències mostrades per Shan i col·laboradors (2010). Aquests estudis mostren que la fosforilació del residu S2808 és essencial per a la resposta a l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica. A més a més, la fosforilació d'aquest residu és necessària per a la sensibilització del RYR2 pel  $Ca^{2+}$  citoplasmàtic podent tenir un paper important en la generació de sortides espontànies de  $Ca^{2+}$  que poguessin acabar generant arrítmies malignes.<sup>102</sup>

Tot i les evidències presentades sobre la importància de S2808 en la resposta  $\beta$ -adrenèrgica, altres autors mostren que aquest residu ja es troba fosforilat en més d'un 50% en situacions de repòs.<sup>98,103</sup> Estudis realitzats per Bovo i col·laboradors (2017) mostren que la fosforilació de S2808 al voltant del 65% de les subunitats redueix la taxa

## Introducció

de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic. En canvi, la màxima fosforilació o desfosforilació augmenten la taxa de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>104</sup>

Tot i que la PKA té més afinitat pel residu S2808, també pot fosforilar el residu S2030 però amb menor afinitat. Xiao i col·laboradors (2005) van analitzar la capacitat de la PKA per fosforilar el residu S2030 en sistemes d'expressió heteròloga. L'expressió del RYR2\_p.S2808A va mostrar que el RYR2 podia ser igualment fosforilat per PKA. L'expressió de RYR2\_p.S2808A-S2030A, que feia que cap dels dos residus poguessin ser fosforilats, va mostrar que PKA no podia fosforilar el RYR2. Mostrant que el residu S2030 pot ser fosforilat per PKA. Estudis funcionals realitzats amb el mateix model van determinar que tant RYR2\_p.S2030A com RYR2\_p.S2030D, simulant el residu fosforilat, presentaven sensibilitats idèntiques al RYR2 WT.<sup>105</sup> Per poder determinar a nivell més fisiològic el paper d'aquest residu en la resposta a l'estímul  $\beta$ -adrenèrgic, Potenza i col·laboradors (2019) van generar el model *knock in* de ratolí RYR2\_p.S2030A<sup>+/+</sup>. Aquest model no mostrava canvis en condicions basals, però durant estimulació  $\beta$ -adrenèrgica es va observar una reducció de sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  respecte al WT. Aquest fet va mostrar la importància de la fosforilació d'aquest residu per a la modulació de la resposta del RYR2 durant l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>106</sup>

La CAMKII és una proteïna multimèrica típicament formada per 12 subunitats. Quan la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  augmenta al citoplasma, la CaM uneix  $\text{Ca}^{2+}$ . La  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM s'uneix a la CAMKII inactiva i li genera un canvi conformacional que trenca l'associació entre la subunitat catalítica i el domini regulador, exposant el domini catalític perquè la CAMKII pugui fosforilar. En condicions en què la unió de la  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM és prolongada, es pot donar l'autofosforilació del residu T287. Aquesta fosforilació té dues funcions: (1) augmentar més de 1000 vegades l'afinitat d'unió de  $\text{Ca}^{2+}$ -CaM al domini regulador de CAMKII, (2) evitar l'autoinhibició de la CAMKII fins i tot si disminueix la concentració de  $\text{Ca}^{2+}$  al citoplasma i la CaM es dissocia de la CAMKII.<sup>107</sup>

S'ha descrit que la CAMKII té la capacitat de fosforilar específicament el residu S2814 del RYR2. Maier i col·laboradors (2003) van realitzar estudis amb un model de ratolí que tenia tres vegades més activitat de CAMKII per determinar l'efecte de la fosforilació del residu S2814 sobre la funció del RYR2. Amb aquest model van determinar que la fosforilació d'aquest residu disminuïa la càrrega de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle sarcoplasmàtic fet que

## Introducció

es podia associar a l'augment de la freqüència de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  observada.<sup>108</sup> La implicació d'aquest residu en la càrrega i en la funció del RYR2 s'ha confirmat en diversos estudis en els quals s'ha generat ratolins *knock in* per RYR2\_p.S2814D, que simula un residu fosforilat. Amb aquest canvi aminoacídic al canal RYR2, els cardiomiòcits tenen un comportament semblant a l'observat per la fosforilació de CAMKII al mateix residu, una disminució de la càrrega del reticle sarcoplasmàtic i un augment en la freqüència de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ . L'ús de ratolins amb el canvi aminoacídic al RYR2 de RYR2\_p.S2814A, que fa que el residu no sigui fosforilable, mostra que la freqüència dels *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$  és molt semblant a la dels animals WT. L'activació de la CAMKII augmenta la freqüència de *sparks* en els animals WT, però no als RYR2\_p.S2814A.<sup>109,110</sup> Aquests experiments mostren la implicació del residu S2814 en l'augment d'activitat del RYR2 induït per la CAMKII.

### 4.5. Efecte funcional de les mutacions en RYR2

Un 85% de les mutacions patogèniques trobades en el gen *RYR2* es troben concentrades en quatre regions anomenades *Hot spot*: (1) el domini N-terminal (residus 44-466) concentra un 18% de les mutacions, (2) el domini central (residus 2246-2534) concentra un 19% de les mutacions, (3) la regió entre el domini central i la regió C-terminal (residus 3778-4201) concentra un 22% de les mutacions, i (4) la regió C-terminal (Residus 4497-4959) concentra un 22% de les mutacions. Tot i així, un 15% de les mutacions patogèniques es localitzen fora dels *Hot spots*.<sup>72,111,112</sup>

La majoria de mutacions identificades en el RYR2 són mutacions *missense* o de canvi de sentit. Aquestes produeixen el canvi d'una sola base que provoca un canvi d'aminoàcid. Menys freqüentment s'han detectat petites insercions, duplicacions i delecions que no afecten el marc de lectura.<sup>111</sup>

L'activació del RYR2 pels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  es pot donar des de la part citosòlica activant el CICR o des de la cara luminal generant el SOICR. Les mutacions estudiades al llarg del RYR2 es troben a la Taula 1. La gran majoria d'aquestes han mostrat alteracions en la sensibilitat del RYR2 als nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal. Aquestes mutacions mostren una disminució del llindar del SOICR associat a un augment de la sensibilitat pel  $\text{Ca}^{2+}$  luminal, per tant, causen un guany de funció al RYR2.<sup>61,62,113-116</sup> En canvi, hi ha altres mutacions que augmenten el llindar al SOICR fent que el RYR2 sigui menys sensible al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal

## Introducció

causant una pèrdua de funció en RYR2.<sup>63,114</sup> Per algunes de les mutacions que causen pèrdua de funció en el RYR2, es va determinar que el llindar de terminació del SOICR no es veia modificat, causant una major fracció de Ca<sup>2+</sup> alliberat en l'activitat SOICR.<sup>63</sup> Tot i que moltes mutacions augmenten la sensibilitat dels RYR2 al Ca<sup>2+</sup> luminal, també hi ha mutacions que afecten la sensibilitat dels RYR2 al Ca<sup>2+</sup> citoplasmàtic sense alterar la sensibilitat a Ca<sup>2+</sup> luminal donat per la dissociació de FKBP12.6.<sup>117,118</sup>

**Taula 1. Mutacions que causen guany o pèrdua de funció en el RYR2 classificades per la seva localització per *Hot spots*.**

Efecte	<i>Hot spot</i>	Mutació	Referències
Augmenten la sensibilitat pel Ca <sup>2+</sup> luminal	Fora del <i>Hot Spot</i> domini N-terminal	H29D	61,62,113–116
	Domini N-terminal	L433P	
	Domini N-terminal- Regió Central	R176Q/T2504M	
	Regió Central	S2446L, R2474S	
	Regió Central- Regió C-terminal	N4104K, Q4201R	
	Regió C-terminal	R4496C, I4867M, N4895D, V4653F	
Disminueixen la sensibilitat pel Ca <sup>2+</sup> luminal	Fora del <i>Hot Spot</i> domini N-terminal	G570D	63
	Regió Central	R4147K	
	Fora del <i>Hot Spot</i> de la Regió Central	A4203V, A4204V	
	Regió C-terminal	L4796S	
Augment de sensibilitat Ca <sup>2+</sup> citoplasmàtic	Domini N-terminal	G230C	117,118
	Regió Central	P2328S	

### 4.5.1. Efecte de les mutacions als dominis N-terminal i regió Central

Segons la regió on es localitza la mutació l'efecte sobre la funció del canal pot variar. En el cas de les mutacions localitzades en el domini N-terminal i en la regió central existeixen dos mecanismes que podrien explicar l'efecte d'aquestes mutacions sobre la funció de RYR2:

-*Domain Unzipping*: La interacció domini N-terminal i la regió central es creu que és clau per a la regulació de l'obertura i tancament del canal. Les mutacions que afecten les interaccions entre aquests dos dominis poden desestabilitzar l'estat tancat del canal

## Introducció

(*unzipping*), fent que sigui més susceptible d'obertura pels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic o luminals generant sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$  en diàstole. L'estudi realitzat per Suetomi i col·laboradors (2011) amb un model de ratolí *knock in* per la mutació RYR2\_p.S2246L, localitzada a la regió central, va mostrar que la mutació reduïa el llindar de càrrega de reticle sarcoplasmàtic necessària per induir l'activació i la inactivació del RYR2 causada per la desestabilització entre la regió central i el domini N-terminal.<sup>119</sup>

-Desestabilització de la unió FKBP12.6: Anteriorment s'ha explicat la importància del FKBP12.6 com a estabilitzador de l'estat tancat del RYR2. Wehrens i col·laboradors (2003) van estudiar l'efecte de les mutacions RYR2\_p.S2246L, RYR2\_p.R2474S i RYR2\_p.R4497C sobre la unió FKBP12.6-RYR2. En registres de canal únic en condicions de  $\text{Ca}^{2+}$  diastòlic, es va determinar que en presència de PKA la  $P_o$  dels canals mutats augmentava. Estudis d'afinitat entre FKBP12.6-RYR2 van mostrar que aquestes mutacions disminuïen l'afinitat d'unió entre ambdues proteïnes.<sup>96</sup> Lehnart i col·laboradors (2008) van analitzar l'efecte funcional de la mutació RYR2\_p.R2474S en un model *knock in* de ratolí. Aquests van determinar que, en presència d'agonistes  $\beta$ -adrenèrgics la dissociació de FKBP12.6 desestabilitzava l'estat tancat del canal fent que pogués ser activable a concentracions diastòliques de  $\text{Ca}^{2+}$  citoplasmàtic donant suport a l'estudi presentat per Wehrens i col·laboradors (2003).<sup>96,115</sup> Com ja s'ha explicat anteriorment, els estudis realitzats per Xiao i col·laboradors (2004) no mostren la dissociació de FKBP12.6 causada per la fosforilació de RYR2 sinó que FKBP12.6 es pot unir tant al canal fosforilat com desfosforilat.<sup>98</sup> Altres estudis realitzats amb models animals i models d'expressió heteròloga no mostren la dissociació de FKBP12.6 dels RYR2 mutats.<sup>61,120</sup> Per tant, el paper de la desestabilització de la unió de FKBP12.6-RYR2 com a causant de l'augment de  $P_o$  queda encara en dubte.

### 4.5.2. Efecte de les mutacions en la regió C-terminal

El mecanisme pel qual mutacions en la regió C-terminal modifiquen la funció del RYR2 encara no és del tot conegut. L'estudi realitzat per Guo i col·laboradors (2021) va analitzar l'efecte de quatre mutacions en la regió C-terminal que causaven un guany de funció al RYR2\_p.P4902S, RYR2\_p.P4902L, RYR2\_p.E4950K i RYR2\_p.G4955E. Aquest estudi va revelar que aquestes mutacions reduïen el llindar d'activació i el de terminació pel SOICR. La mutació RYR2\_p.G4955E induïa l'activació del RYR2 independent de  $\text{Ca}^{2+}$ ,

## Introducció

mostrant una activitat basal molt més elevada que les altres mutacions. En canvi, les mutacions RYR2\_p.P4902S i RYR2\_p.E4950K mostraven un augment de dependència dels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  per a l'activació del RYR2. La mutació RYR2\_p.P4902L a diferència de les altres no va mostrar canvis en l'activació dependent de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Registres de canal únic van mostrar un augment en la  $P_o$  del RYR2\_p.G4955E, respecte al WT, en nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlics baixos. En canvi, a nivells més alts de  $\text{Ca}^{2+}$  no es van observar diferències. Modulant els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals es va observar que RYR2\_p.G4955E augmentava la seva  $P_o$  dràsticament a nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals molt baixos. Aquests registres de canal únic indiquen que la mutació RYR2\_p.G4955E desestabilitza l'estat tancat del canal augmentant la sensibilitat dels RYR2 pels nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals.

Estudis estructurals van mostrar que l'aminoàcid G4955 es localitzava entre la regió C-terminal i el motiu U, regió molt rica amb aminoàcids carregats tant positivament com negativament. Això suggereix que aquesta regió és important en la generació d'interaccions electroestàtiques podent estar involucrada en l'estabilitat del canal. La substitució de G4955 per leucina (G4955L, no carregat electroestàticament) o per lisina (G4955K, aminoàcid carregat positivament) va induir una disminució de l'activació del RYR2 independent de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquests resultats mostren la importància de les interaccions electroestàtiques per mantenir les interaccions de les regions C-terminals entre subunitats del RYR2, evidenciant la importància d'aquestes en el manteniment de l'estat tancat del canal.<sup>72</sup>

L'estudi realitzat per Guo i col·laboradors (2021) mostra el mecanisme pel qual mutacions situades en la regió C-terminal poden alterar la sensibilitat del RYR2 al  $\text{Ca}^{2+}$  luminal i acabar generant arrítmies ventriculars malignes als pacients portadors.

### 5. Models per l'estudi de la CPVT

Clàssicament per l'estudi de malalties arritmogèniques hereditàries s'han generat models *knock in* de ratolí en els quals se'ls inserta la mutació d'interès o s'han utilitzat models d'expressió heteròloga per expressar el RYR2 amb la mutació d'interès. Com ja s'ha comentat anteriorment a l'apartat 3.4, el patrimoni genètic dels pacients juga un paper molt important en la regulació de la penetrància i l'expressivitat del fenotip. La

## Introducció

complexitat d'obtenció i de manteniment de cardiomiòcits humans va portar als investigadors a la cerca d'altres models com les cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC), per poder estudiar així l'efecte de mutacions hereditàries i com el patrimoni genètic dels individus podria modular l'expressió del fenotip.<sup>121</sup>

### 5.1. Cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC)

Els intents d'aconseguir cèl·lules en estat totipotent o pluripotent van començar amb transferència nuclear somàtica entre els anys 50 i 60. Aquesta tècnica consistia en la transferència del nucli d'una cèl·lula somàtica a un oòcit enucleat per tal d'induir la transició cap a un estat indiferenciat.<sup>122,123</sup> Més tard, l'any 1981, es van poder aïllar per primera vegada cèl·lules mare embrionàries (ESC) de la massa interna de blastocists de ratolí. Aquestes cèl·lules es trobaven en estat pluripotent, per tant, tenien la capacitat natural de poder diferenciar-se a qualsevol llinatge cel·lular de les tres capes germinals.<sup>124,125</sup> No va ser fins a l'any 1994 que es van poder aïllar per primer cop ESC de blastocists humans.<sup>126</sup> En experiments realitzats per Cowan i col·laboradors l'any 2005, es va fusionar ESC humanes amb fibroblasts humans. La fusió va donar lloc a una cèl·lula tetraploide amb característiques d'ESC. Aquest estudi va revelar que les ESC podien reprogramar l'estat transcripcional d'una cèl·lula somàtica, deixant veure que podien existir factors de transcripció responsables d'aquesta alteració transcripcional en les ESC.<sup>127</sup> Els problemes ètics derivats de l'ús d'embrions per a l'obtenció de ESC comprometien el seu ús.

L'any 2006, Takahashi i Yamanaka van descriure per primera vegada la reprogramació de cèl·lules somàtiques transduïnt amb vectors virals factors de transcripció expressats a ESC (responsables del manteniment de l'estat pluripotent en embrions en fases inicials i en cèl·lules mare embrionàries) i de factors de transcripció sobreexpressats en tumors (que ajudaven a mantenir el fenotip d'ESC i promoure la ràpida proliferació). Les colònies de cèl·lules obtingues per aquests investigadors es van anomenar cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC). Aquestes presentaven una morfologia, característiques bioquímiques, perfils d'expressió molt semblants a les cèl·lules ESC i tenien la capacitat de diferenciar-se a llinatges cel·lulars de les tres capes germinals. Aquests investigadors van determinar que la combinació de l'expressió dels factors de transcripció Oct3/4, SOX2, c-Myc i KLF4 formaven l'eix central per a la inducció i manteniment de la



## Introducció

pluripotència de les iPSC.<sup>128</sup> Poc temps després, aquests investigadors van mostrar la capacitat de reprogramació d'aquests quatre factors de transcripció amb fibroblasts humans.<sup>129</sup>

La capacitat de les iPSC de poder-se diferenciar a qualsevol tipus cel·lular de qualsevol de les tres capes germinals, va portar a la generació de diferents protocols per a la diferenciació dirigida cap a diferents tipus cel·lulars. En el nostre cas, ens centrarem en l'explicació del protocol de diferenciació a cardiomiòcits.

### 5.2. Cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC-CM)

L'estudi tant fisiològic com molecular dels cardiomiòcits humans és tècnicament difícil, degut a la complexitat d'obtenció i de manteniment dels mateixos en cultiu pel seu estudi. Les iPSC representen una font prometedora per a l'obtenció de cardiomiòcits humans i, a més a més, amb el patrimoni genètic del pacient.<sup>121</sup>

Actualment, existeixen diferents tipus de protocols de diferenciació basats en l'ús de moduladors de la via de transducció del senyal WNT. Els primers protocols es basaven en la formació de cossos embrionaris en gotes penjants en medis lliures de sèrum, i en la modulació de les vies de senyalització Activin/Nodal/TGF $\beta$ , WNT/ $\beta$ -Catenina i BMP per a l'obtenció de *beating bodies*.<sup>130</sup> L'ús d'aquest tipus de protocol genera diferenciacions molt heterogènies entre línies cel·lulars, i l'eficiència de diferenciació és de  $\leq 20\%$ .<sup>131,132</sup>

Una alternativa més recent són les diferenciacions en 2D o en monocapa realitzades sobre matrius químicament caracteritzades com el matrigel, la vitronectina o altres. Aquests representen una bona alternativa respecte als cossos embrionaris, ja que generen una capa uniforme que redueix els problemes de difusió presents en els cossos embrionaris fent que les diferenciacions siguin més controlades i reproduïbles.<sup>131</sup> Actualment protocols basats en l'ús de petites molècules per modular la via WNT aconseguixen una eficiència de diferenciació de  $\geq 90\%$ .<sup>133-135</sup> En aquesta tesi doctoral s'usarà per a la diferenciació de les iPSC a cardiomiòcits derivats de cèl·lules mare pluripotents induïdes (iPSC-CM) el protocol descrit per Lin i col·laboradors (2017). En aquest protocol s'utilitzen com a moduladors de la via WNT el CHIR99021, IWP2, heparina i insulina. Aquest mètode té una relació cost-eficiència molt alt obtenint  $\geq 90\%$  de cardiomiòcits en cada diferenciació.<sup>136</sup>

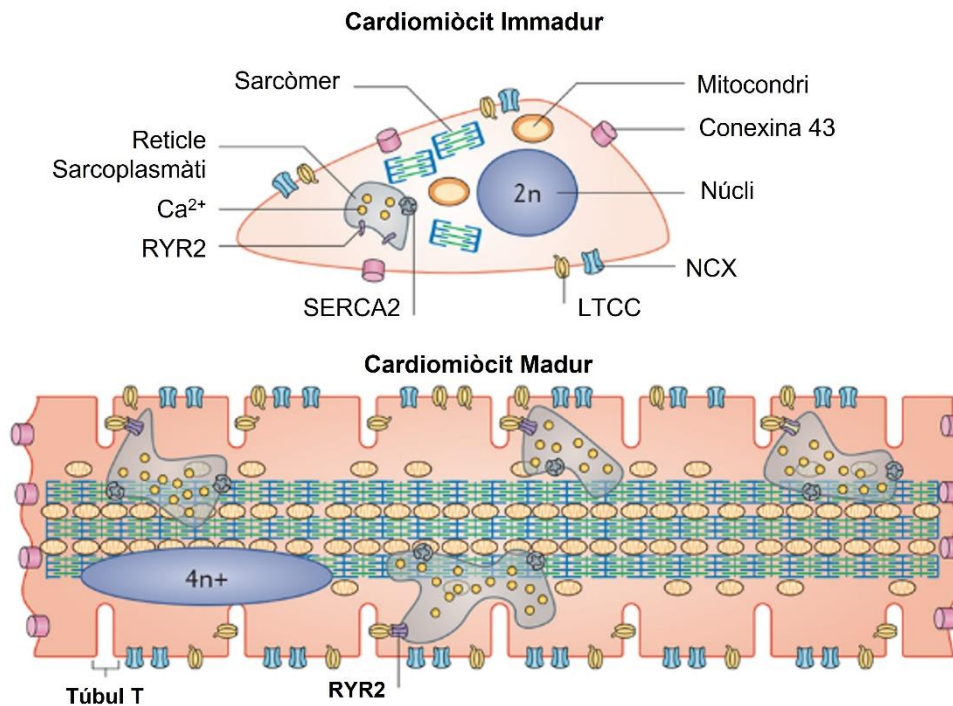
## Introducció

Per poder augmentar la puresa de les diferenciacions en monocapa d'iPSC-CM, s'ha proposat l'ús de medis que substitueixen la glucosa per lactat. S'ha vist que el tractament d'entre 6 i 10 dies amb aquests medis augmenta la puresa dels cultius, eliminant aquelles cèl·lules que no estan correctament diferenciades.<sup>134,137</sup> Tot i això, els iPSC-CM presenten una sèrie de limitacions que dificulten el modelatge de patologies, ja que mostren propietats electrofisiològiques, bioquímiques i estructurals immadures. En el següent apartat s'explicarà el fenotip immadur dels iPSC-CM.

### 5.3. La immaduresa dels iPSC-CM

La majoria dels protocols de diferenciació generen cardiomiòcits amb característiques més semblants a cardiomiòcits d'estadis embrionaris o a estadis fetals primerencs. Aquests cardiomiòcits presenten un seguit de característiques que les allunyen dels cardiomiòcits madurs: (1) volum molt inferior, (2) un nombre menor de mitocòndries, (3) baixa organització de l'aparell contràctil, (4) composició de canals iònics al sarcolemma més semblant als cardiomiòcits immadurs que als adults (presència de  $I_f$ , baixa presència de  $I_{K1}$ , isoforma embrionària de  $I_{Na}$  i altres) i (5) falta de túbuls T (Figura 14). Aquestes característiques que diferencien els cardiomiòcits immadurs dels madurs són essencials pel modelatge de malalties, regeneració de teixits o per proves de tractaments farmacològics.

## Introducció



**Figura 14. Comparació de l'organització estructural entre un cardiomiòcit immadur (iPSC-CM, part superior) i un cardiomiòcit madur (part inferior).** Modificada de Karbassi i col·laboradors (2020).<sup>138</sup>

Focalitzant-nos a nivell de la dinàmica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, com ja hem explicat anteriorment a l'apartat 2.2, l'acoblament E-C a l'adult inclou la propagació del potencial d'acció pel sarcolemma i pels túbuls T, que promou l'obertura dels LTCC. L'entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  des de l'exterior pels LTCC serà la responsable de l'obertura del RYR2, causant l'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  des del reticle sarcoplasmàtic i promovent la contracció.<sup>10,138</sup> Els cardiomiòcits immadurs i els iPSC-CM no presenten túbuls T, cosa que fa que la distància entre els LTCC i els RYR2 sigui major que en l'adult produint un retard en el CICR. També s'ha observat que la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat és més lenta en iPSC-CM, que podria explicar-se per una alta relació PLN:SERCA2.<sup>138,139</sup> Tots aquests fets indiquen que els iPSC-CM presenten una dinàmica del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular i un acoblament E-C diferent a l'adult. Per aquest motiu, l'aplicació de tractaments d'estimulació mecànica, hormonal i altres són necessaris per a la maduració fenotípica dels iPSC-CM per millorar el modelatge de malalties cardíaques al laboratori.

### 5.4. Maduració dels iPSC-CM

La immaduresa dels iPSC-CM pot representar una limitació per al seu ús com a model fisiològicament representatiu de l'adult. La fisiologia cardíaca depèn tant de la maduresa estructural, electriofisiològica com metabòlica. Per aquest motiu, des del descobriment dels primers protocols de diferenciació dirigida a cardiomiòcits s'han intentat diverses aproximacions per induir la maduració dels iPSC-CM per fer-los fisiològicament més semblants als adults. A continuació explicarem algunes de les aproximacions experimentals utilitzades fins al moment.

La primera aproximació que es va fer va ser la de mantenir els iPSC-CM en cultiu per un llarg període de temps. Aquests experiments s'han fet tant amb diferenciacions en 2D com en cossos embrionaris, i el rang de cultiu va des de quatre setmanes a 1 any. Alguns d'aquests estudis han revelat que cultius a llarg termini poden induir canvis en l'organització del sarcòmer i en alguns casos hipertròfia cel·lular, però tot i així no s'ha observat en cap cas la presència de túbuls T.<sup>140-143</sup>

Altres aproximacions s'han focalitzat en la mimetització de l'ambient cardíac per tal de poder induir la maduració dels iPSC-CM. En aquests casos els iPSC-CM són sembrats sobre matrius amb rigideses semblants a la matriu extracel·lular del cor per tal de poder formar un cultiu en 2D o 3D. Aquests cultius són estimulats tan elèctricament com mecànicament a diferents freqüències per modular la maduració dels iPSC-CM. La combinació d'aquests factors promou la hipertròfia dels cardiomiòcits, l'alineament dels iPSC-CM i dels sarcòmers en la direcció de l'estímul, l'augment d'expressió de gens cardíacs, una major contractilitat i una millora en la dinàmica del  $Ca^{2+}$  intracel·lular. Tot i que la combinació d'aquestes tècniques indueix una millora en la maduresa dels cardiomiòcits a nivell econòmic és molt costós i, per aquest motiu complica la seva implantació en molts laboratoris.<sup>29,144-146</sup>

Altres alternatives més assumibles per ser implantades per a molts laboratoris sense necessitat d'un cultiu molt llarg ni una gran inversió econòmica és l'ús de diferents molècules per augmentar la maduració dels iPSC-CM. Aquestes molècules inclouen el Torin 1, l'àcid asiàtic combinat amb GW501516, la 3,3',5-Triiodo-L-tironina (T3) combinada amb Dexametasona (Dex) i altres.<sup>138,147-149</sup>

## Introducció

La T3 és una hormona tiroidea implicada en el desenvolupament cardíac. L'estudi realitzat amb xais per Chattergoon i col·laboradors (2012) mostra que la T3 juga un paper molt important en la maduració dels cardiomiòcits durant el desenvolupament embrionari promovent la hipertròfia i la binucleació dels cardiomiòcits.<sup>150</sup> La Dex és una hormona glucocorticoidea que juga un paper important a nivell perinatal, regulant l'expressió de gens associats amb el canvi de metabolisme basat en carbohidrats cap a la oxidació dels àcids grassos en els cardiomiòcits i induint la maduració dels cardiomiòcits a nivell metabòlic.<sup>151</sup> L'efecte combinat de les dues hormones ha estat ja provat en els iPSC-CM en dos estudis. A l'estudi dut a terme per Parikh i col·laboradors (2017) combinen l'ús de matrius de matrigel amb el tractament de T3+Dex. Aquests van poder observar la formació de túbuls-T, una millora en el CICR i un acoblament E-C més semblant al ventricular.<sup>149</sup> Estudis més recents realitzats per Wang i col·laboradors (2021) han mostrat com el tractament amb T3+Dex sense matriu de matrigel induïx la maduració a nivell electrofisiològic dels iPSC-CM. Mostren que els iPSC-CM presenten un potencial de membrana més hiperpolaritzat, un potencial d'acció més curt, increments en les corrents  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  i  $I_{Ks}$  i una reducció de  $I_f$ . Únicament van ser necessàries les matrius de matrigel per induir l'augment en la  $I_{Na}$ . L'augment de l'expressió dels gens associats a les corrents  $I_{K1}$  (*KCNJ2* / *KCNJ12*),  $I_{Kr}$  (*KCNH2* / *KCNE2*) i  $I_{Ks}$  (*KCNQ1*) i la reducció de la corrent  $I_f$  (*HCN4*) indicaria el canvi a un fenotip electrofisiològic més madur, millorant l'excitabilitat cardíaca i la velocitat de conducció del potencial d'acció als iPSC-CM.<sup>152</sup>

Tot i les millores tècniques per a la maduració dels iPSC-CM, encara no s'ha aconseguit generar iPSC-CM amb un grau de maduresa suficient com per poder ser comparats amb els cardiomiòcits adults.

### 5.5. Variabilitat en la diferenciació de les iPSC a iPSC-CM

Tot i que els iPSC-CM representen un model prometedor per a l'estudi de malalties arritmogèniques, les diferenciacions dirigides presenten tres problemes importants pel modelatge de les mateixes: la immaduresa dels iPSC-CM obtinguts, l'heterogeneïtat i la variabilitat en les poblacions cel·lulars obtingudes en cada diferenciació. Les fonts que introdueixen variabilitat en les diferenciacions poden ser molt diverses. Poden influir variants intrínseques com: (1) alteracions a nivell genètic o epigenètic generant

## Introducció

subpoblacions dins el mateix cultius d'iPSC, (2) el pacient i teixit del qual s'han obtingut les cèl·lules per a la reprogramació, (3) l'heterogeneïtat transcripcional i de l'epigenoma al moment d'iniciar la diferenciació i (4) la fase del cicle cel·lular a la qual es troben les iPSC al moment d'iniciar la diferenciació. També, hi ha variants extrínseques que poden introduir variabilitat a les diferenciacions com: (1) les condicions de cultius (medi utilitzat, la tècnica de passatge, el substrat on es sembren les iPSC, el pH del medi), (2) la confluència de les iPSC, (3) la concentració de CHIR99021 per iniciar la diferenciació, entre molts altres.<sup>153</sup>

Cada una de les diferenciacions a iPSC-CM presenta un rang de variabilitat i heterogeneïtat en la població resultant. Normalment, hi ha una combinació de iPSC-CM i cèl·lules que no ho són en proporcions variables entre diferenciacions. Churko i col·laboradors (2018) van realitzar un estudi de *single-cell* RNA-seq en el qual van analitzar diferenciacions a quatre punts temporals (dia 0, 5, 14 i 45 des de l'inici de diferenciació). Des de l'inici de la diferenciació fins a dia 45 aquests investigadors van poder identificar l'aparició de 20 subpoblacions diferents des d'iPSC: cèl·lules de llinatge endodèrmic, ectodèrmic, mesodèrmic i cardiomiòcits auriculars i ventriculars en diferents estadis de maduresa. Un anàlisi més detallat realitzat entre els dies 0 i 90 amb 13 punts en el temps va mostrar que hi havia un enriquiment de marcadors estructurals i de contracció entre els dies 7 i 90, indicant que llargs períodes de temps de cultiu indueixen un estat més madur als iPSC-CM.<sup>154</sup>

La variabilitat entre poblacions dificulta la interpel·lació en estudis a nivell molecular de preparacions multicel·lulars, per això diferents estudis han analitzat la utilitat de diferents proteïnes tant a nivell de superfície cel·lular com citoesquelètiques per poder determinar la proporció de iPSC-CM dins de cada mostra. A nivell citoesquelètic, principalment s'han utilitzat com a marcadors de cèl·lules diferenciades la troponina T (codificada pel gen *TNNT2*) i  $\alpha$ -actinina (codificada pel gen *ACTN2*). Aquestes dues proteïnes han estat àmpliament usades com a marcadors de cardiomiòcits, ja que es troben presents únicament als iPSC-CM diferenciats en qualsevol estat de maduresa.

134,137,147,155

A nivell extracel·lular hi ha diversos marcadors que permeten diferenciar els iPSC-CM de les cèl·lules no diferenciades com el SIRPA, VCAM1 i ALCAM. VCAM1 i ALCAM són

## Introducció

expressats en cardiomiòcits de ratolí en etapa embrionària entre els dies 8 i 15 de gestació.<sup>156</sup> VCAM1 i ALCAM han mostrat ser eficients com a marcadors per identificar iPSC-CM de cèl·lules no diferenciades correctament, però, aquests dos marcadors s'han associat a cardiomiòcits immadurs, per tant, el seu ús no pot ser estès com a marcador, a no ser que sigui en etapes inicials de diferenciació.<sup>157,158</sup> SIRPA s'ha comprovat que és coexpressa amb la troponina T als iPSC-CM, indicant que la seva expressió és específica de cardiomiòcits i no depèn de la maduresa dels cardiomiòcits.<sup>159</sup>

### 5.6. iPSC-CM en l'estudi de mutacions en el RYR2

Tot i les limitacions que presenten els iPSC-CM aquests són un model amb molt potencial per poder estudiar l'efecte de mutacions en el RYR2 d'una forma més acurada, ja que uneixen dos factors essencials per estudiar el fenotip de la malaltia: (1) els iPSC-CM permeten estudiar el fenotip de la mutació en un ambient cardíac que fins al moment només s'havia pogut aconseguir utilitzant models animals *knock in* i (2) permeten determinar l'efecte de la mutació dins el patrimoni genètic de l'individu. Aquests dos fets fan que els iPSC-CM siguin un bon model per a l'estudi d'una canalopatia hereditària com és la CPVT.

Moltes mutacions al RYR2 s'han estudiat realitzant la reprogramació de cèl·lules somàtiques dels propis pacients o introduint la mutació en línies iPSC control mitjançant la tècnica d'edició genètica del CRISPR-Cas9 per determinar l'efecte real de la mutació sense tenir en compte com el patrimoni genètic pot modular el fenotip. La majoria de mutacions estudiades fins al moment utilitzant iPSC-CM són variants d'un sol nucleòtid que generen un canvi d'aminoàcid al llarg del RYR2.<sup>160-177</sup> També s'han generat models d'iPSC per mutacions d'un sol nucleòtid que generen l'aparició d'un codó STOP prematur com la RYR2\_c.C14368T que genera una proteïna més curta perdent 177 aminoàcids de la regió C-terminal (Taula 2).<sup>178</sup>

## Introducció

Taula 2. Classificació de mutacions d'un sol canvi de nucleòtid estudiades en iPSC-CM segons si es troben dins del *Hot Spots* o no al llarg del RYR2.

<i>Hot Spot</i>	Mutació	Referències
<b>Fora del <i>Hot Spot</i> del domini N-terminal</b>	H29D	160
<b>Domini N-terminal</b>	R176Q	161
	S406L	162
	R420Q	163,164
<b>Regió Central</b>	E2311D	165
	P2328S	166–168
	F2438I	164,169–171
<b>Fora del <i>Hot Spot</i> de la Regió Central</b>	T2538R	167
	D3638A	175
	L3741P	176
<b>Regió Central – C-terminal</b>	M4109R	177
	L4115F	167,172,173
	Q4201R	164,167
<b>Regió C-terminal</b>	I4587V	174
	V4653F	167,172
	R4790Ter	178

De forma menys abundant, també s'han detectat casos de duplicacions i delecions en el gen *RYR2*. Fins al moment s'ha generat un model iPSC per deleció de l'exó 3<sup>172,173</sup> i un model per una duplicació en tàndem de 344.085 bases que inclou aproximadament 26.000 bases de regió intergènica, la regió 5'UTR/regió promotora i els exons de l'1 al 4.<sup>179</sup>

Tots aquests models han mostrat la necessitat d'exposar el iPSC-CM a catecolamines com l'adrenalina o agonistes  $\beta$ -adrenèrgics com l'isoproterenol, per desemascarar anomalies en els potencials d'acció i en els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars com podrien ser els DADs i en menor freqüència els EADs. Només en el cas de la mutació RYR2\_p.H29D es van poder observar la presència de DADs en estat basal, efecte que no es veia augmentat amb l'aplicació d'agonistes  $\beta$ -adrenèrgics. Això mostrava que la mutació ja induïa un augment de funció del RYR2 sense necessitat de l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>160</sup>

Els iPSC-CM a part de mostrar la capacitat de recapitular a nivell cel·lular mecanismes patofisiològics de la CPVT en el laboratori, han permès la realització de tests farmacològics per determinar l'efecte antiarrítmic de diferents fàrmacs com el



## Introducció

dantrolene<sup>162,164,167</sup>, KN-93<sup>165</sup>, flecainida<sup>164,172,173,175,176</sup>, nadolol<sup>176,179</sup>, S107<sup>174,175</sup>, metropolol<sup>175</sup>, propranolol<sup>179</sup>, carvedilol<sup>172,173,178</sup>, EL20<sup>161</sup>, JVT519<sup>164</sup>, neviridol<sup>178</sup>, i labetalol<sup>178</sup>. Aquests fàrmacs han mostrat diferents eficàcies com agents antiarrítmics segons la localització de les mutacions en el RYR2, mostrant la rellevància de l'ús dels iPSC-CM per l'*screening* de fàrmacs antiarrítmics per a millorar el tractament dels pacients.

## **II. Plantejament de la recerca**



## Plantejament de la recerca

A l'apartat 1 de la introducció, s'ha descrit la identificació de la mutació RYR2\_p.G357S com a causant dels casos de CPVT en una família de més de 2000 individus residents al sud de l'illa de Gran Canària. Fins al moment, la mutació ha estat estudiada en models d'expressió heteròloga per determinar quin és l'efecte de la mutació sobre la funció del RYR2.

El primer estudi va ser realitzat per Wangüemert i col·laboradors (2015). Aquests investigadors van utilitzar un model de HEK-293T estable i induïble per RYR2\_WT o RYR2\_p.G357S, per determinar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S sobre la funció del RYR2. En condicions basals, no van observar diferències ni en les corbes concentració-resposta de cafeïna ni en l'activitat SOICR entre el RYR2\_WT i RYR2\_p.G357S. En canvi, en condicions que mimetitzaven l'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, usant forskolina per augmentar els nivells de cAMP intracel·lulars, van observar que tant la sensibilitat a cafeïna com l'activitat SOICR del RYR2\_p.G357S era major que en el WT. El canvi aminoacídic G357S suggeria que es pogués haver generat un nou lloc de fosforilació per PKA. Estudis de fosforilació *in vitro* van determinar que no es podia produir la fosforilació d'aquest residu. Tots els resultats en conjunt mostraven que l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica era necessària per a desemmascarar el fenotip patològic de la mutació, podent ser la responsable de l'expressivitat variable i la baixa penetrància (46,3%) observada en la família.<sup>1</sup>

La caracterització de la mutació va seguir amb l'estudi realitzat per Liu i col·laboradors (2017). Aquests investigadors van utilitzar el mateix model cel·lular que Wangüemert i col·laboradors (2015) per determinar quins mecanismes podrien explicar la penetrància incompleta de la mutació RYR2\_p.G357S. L'estudi del SOICR va mostrar que disminuïa el nombre de cèl·lules RYR2\_p.G357S amb activitat SOICR. La mutació RYR2\_p.G357S disminuïa el llindar d'activació del SOICR augmentant la susceptibilitat a què es produïssin sortides espontànies de  $\text{Ca}^{2+}$ . Aquestes a part tenien una amplitud major donat per un retard en la finalització del SOICR, fet que produïa un augment de la fracció del  $\text{Ca}^{2+}$  alliberada. Els estudis amb cèl·lules permeabilitzades van mostrar que la mutació RYR2\_p.G357S no afectava l'activació dependent de  $\text{Ca}^{2+}$  citosòlic ni la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberada induïda per concentracions de  $\text{Ca}^{2+}$  ascendents.

## Plantejament de la recerca

Estudis de western blot, van determinar que la mutació RYR2\_p.G357S disminuïa la quantitat de RYR2. Aquest resultat podria explicar la disminució de cèl·lules oscil·lants en els experiments de SOICR. Per determinar la causa d'aquesta disminució de proteïna, van estudiar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S en el domini N-terminal. Aquests investigadors van expressar el domini N-terminal (subdominis N-A, N-B i N-C) i van determinar-ne l'estabilitat segons la temperatura. Els resultats van mostrar que la mutació RYR2\_p.G357S tenia un efecte intrínsec de desestabilització. Segons aquest estudi, la desestabilització del domini N-terminal del RYR2 produiria un guany de funció però al mateix temps una pèrdua de funció associada a la disminució de la quantitat de RYR2.<sup>180</sup>

Les evidències presentades per Wangüemert i col·laboradors (2015)<sup>1</sup> i Liu i col·laboradors (2017)<sup>180</sup> mostren que la mutació RYR2\_p.G357S indueix un guany de funció al RYR2. La disminució dels llindars d'activació i de finalització sumat a l'augment de l'activitat SOICR en estimulació  $\beta$ -adrenèrgica podria explicar l'aparició d'arrítmies ventriculars malignes en situacions d'estrès en els pacients de CPVT. També Liu i col·laboradors (2017)<sup>180</sup> van proposar que la variabilitat d'expressió de fenotips dins la família podria donar-se per la disminució de la quantitat de RYR2 associada a la desestabilització del domini N-terminal, i pel baix efecte de la mutació sobre l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  de RYR2. Aquestes podrien ser les causes que expliquessin la penetrància incompleta i l'expressivitat variable de la mutació RYR2\_p.G357S.

Moltes mutacions associades a CPVT s'han estudiat tant a nivell funcional com a nivell molecular utilitzant les cèl·lules HEK-293T com a model cel·lular, però aquest model presenta diverses limitacions: (1) no presenten proteïnes cardíques que podrien modular l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S i (2) no contenen el patrimoni genètic dels individus, que com ja s'ha explicat anteriorment a l'apartat 3.4 de la introducció, tindria un paper important en la penetrància i l'expressivitat del fenotip. Tenint presents les limitacions d'aquest model per a l'estudi a nivell fisiològic de les alteracions generades per RYR2\_p.G357S, l'objectiu d'aquesta tesi doctoral és estudiar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S en iPSC-CM d'individus de la gran família de l'illa de Gran Canària. Per així poder determinar de forma més acurada el fenotip patofisiològic de la mutació i com

## Plantejament de la recerca

aquest es pot veure modulats pel patrimoni genètic dels individus per poder explicar la variabilitat de fenotips observats dins d'aquesta gran família.

Per aquest motiu s'han seleccionat dos individus homozigots i tres heterozigots per la mutació RYR2\_p.G357S dins d'aquesta família, els quals havien presentat fenotips diferents per tal de poder determinar com la mutació afecta a la funció, l'expressivitat i a la quantitat del RYR2 i com el patrimoni genètic afecta a la penetrància incompleta i l'expressivitat variable del fenotip de la malaltia.



### **III. Hipòtesis i Objectius**





## Hipòtesis i objectius

En la secció anterior hem presentat els resultats obtinguts fins al moment en la caracterització funcional i molecular de l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S en el model estable i induïble de HEK-293T. En aquesta tesi ens hem proposat realitzar estudis fisiològicament més rellevants utilitzant iPSC obtingudes de la reprogramació dels fibroblasts dels propis individus, i diferenciar-les a iPSC-CM per avaluar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S i com el patrimoni genètic dels diferents individus modula l'expressivitat i penetrància del fenotip. Partint d'aquesta base, ens hem plantejat una hipòtesi central per l'estudi que és: **El guany de funció associat a la mutació RYR2\_p.G357S és dependent del nombre d'al·lels mutats i del patrimoni genètic dels individus donants.**

Per confirmar la hipòtesi plantejada, hem subdividit la hipòtesi en subhipòtesis:

- I. La maduració dels iPSC-CM permet obtenir un model fisiològicament rellevant per a l'estudi de l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S en els iPSC-CM individu específics.
- II. El fenotip donat per la mutació RYR2\_p.G357S altera la funcionalitat dels RYR2, alterant l'homeòstasi del  $Ca^{2+}$  intracel·lular únicament quan s'indueix l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica en situacions d'estrès, podent ser modulable pel nombre d'al·lels mutats.
- III. El guany de funció al RYR2 causat per la mutació RYR2\_p.G357S es veu mitigat per la reducció de la quantitat de proteïna present en els iPSC-CM.
- IV. El patrimoni genètic dels individus modula la severitat del fenotip de la mutació RYR2\_p.G357S.

Per avaluar aquestes subhipòtesis, ens hem proposat els següents objectius específics:

- I. Diferenciar les iPSC a iPSC-CM tant de l'individu control sa com dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en homozigosi i en heterozigosi.
- II. Induir la maduració dels iPSC-CM usant la combinació d'hormones T3+Dex i avaluar l'efecte a nivell funcional del tractament.

## Hipòtesis i objectius

- III. Caracteritzar a nivell funcional per imatges de  $\text{Ca}^{2+}$  l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S sobre la funcionalitat del RYR2 en els iPSC-CM tant en condicions basals com en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic.
- IV. Determinar l'efecte del nombre d'al·lels mutats i del patrimoni genètic sobre la modulació del fenotip de la mutació RYR2\_p.G357S.
- V. Avaluar com la mutació RYR2\_p.G357S afecta l'expressivitat i la quantitat del RYR2.

## **V. MATERIAL I MÈTODES**



### 1. Selecció dels individus

#### 1.1. Selecció dels individus per l'estudi

Els individus inclosos dins aquest estudi es van seleccionar de la gran família de l'Illa de Gran Canària portadora de la mutació RYR2\_p.G357S descrita per Wangüemert i col·laboradors (2015).<sup>1</sup> Des de l'associació de la mutació RYR2\_p.G357S amb els casos de MSC dins aquesta gran família, es va realitzar un estudi a nivell genètic per identificar els individus portadors de la mutació. Tots els individus que van accedir a realitzar-se el test genètic i se'ls va trobar la mutació, sigui en homozigosi o heterozigosi, se'ls va iniciar el tractament amb  $\beta$ -bloquejants i en els casos més greus es va optar per la implantació d'un DAI.

Dins d'aquesta gran família es van seleccionar cinc individus basant-nos en els seus genotips i fenotips (Taula 3). Els individus CPVT-51 i CPVT-55 són germans i tots dos són heterozigots. L'individu CPVT-51 va patir un presíncope a 19 anys fet que va fer que els clínics li implantessin un DAI i el tractessin amb metropolol. Poc temps després de la implantació del DAI, aquest el va salvar d'una MSC a 21 anys. La germana, en canvi (CPVT-55), en canvi, no ha presentat mai cap símptoma. Tot i així, des del diagnòstic del germà i la seva identificació com a portadora de la mutació se li va iniciar el tractament amb propranolol i se li van donar recomanacions d'estil de vida.

Els individus CPVT-52 i CPVT-53 tenen un parentesc de segon grau, ja que són primera (CPVT-52) i tercera generació (CPVT-53) del mateix nucli familiar. L'individu CPVT-52 és heterozigot per la mutació i va patir un síncope a 39 anys, previ al seu diagnòstic genètic. Derivat d'aquest episodi se li va implantar un DAI i se li va iniciar el tractament amb  $\beta$ -bloquejants. Però voluntàriament va abandonar el tractament farmacològic. En canvi, l'individu CPVT-53, va presentar un síncope a 8 anys. Després d'aquest episodi se li va iniciar el tractament amb nadolol i se li va implantar un DAI.

L'individu CPVT-54, portador de la mutació en homozigosis, no guarda cap parentesc directe amb cap dels altres individus. Aquest individu, abans de l'associació de la mutació RYR2\_p.G357S amb els casos de CPVT ja havia patit dos episodis de síncope en situacions d'estrès físic, el primer a 8 anys. Per aquest motiu se li va implantar un DAI i, a més a més, també se'l va tractar amb propranolol.

## Material i mètodes

**Taula 3. Descripció dels individus inclosos dins l'estudi.**

Identificació	Edat	Sexe	Genotip	Simptomatologia	Tractament
CPVT-51	25	Home	Heterozigot	Presíncope als 19 anys i MSC recuperada als 21 anys	DAI+Metropolol
CPVT-52	58	Dona	Heterozigot	Síncope als 39 anys	DAI
CPVT-53	10	Home	Homozigot	Síncope als 8 anys	DAI+Nadolol
CPVT-54	49	Home	Homozigot	Dos síncope, el primer als 8 anys	DAI+Propanolol
CPVT-55	32	Dona	Heterozigot	No coneguts	Propranolol

### 1.2. Obtenció de les biòpsies de pell

L'extracció de les biòpsies de pell es va fer utilitzant un punxó estèril, amb el qual es va fer la incisió i amb l'ajuda d'unes pinces es va extreure el fragment de pell que contenia la dermis. Les biòpsies es van emmagatzemar a 4°C en medi de cultiu per a fibroblasts (Taula 4) des de l'extracció fins al seu processament.

**Taula 4. Composició del medi de cultiu de fibroblasts.**

Composició	Referència	Concentració
DMEM, high glucose, GlutaMAX <sup>(TM)</sup> , HEPES	32430-027, Gibco-Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA)	1X
Gentamicina/Amfotericina 500X	R-015-10, Gibco-Thermo Fisher Scientific	1X
Sèrum fetal boví HyClone	SH30071.03H Cytiva Life Science (Emeryville, MA, USA)	10%
Penicil·lina/estreptomocina	P4333-100ML, Sigma-Aldrich (Sain Louis, MI, EUA)	1%

### 1.3. Processament de les biòpsies de pell per a l'expansió dels fibroblasts

En una placa de 100 mm es va col·locar la biòpsia de pell amb una petita quantitat de medi de cultiu de fibroblasts. Amb l'ajuda de dos bisturís estèrils, la mostra es va trossejar en uns 12-15 fragments, depenent de la mida de la mostra inicial. Utilitzant pinces estèrils es van repartir els fragments de pell als tres pous superiors d'una placa de 6 pous. Tot seguit, es va col·locar sobre un cobreobjectes de 15 mm estèril. Amb l'ajuda de pinces es va pressionar suaument al mateix temps que a poc a poc es van afegir 2 mL de medi per fibroblasts. Els fragments de teixit es van deixar en condicions estàndard de cultiu (37 °C i 5% de CO<sub>2</sub>) durant 7 dies. El primer canvi de medi es va fer passats 7 dies, i a partir d'aquest dia es va canviar el medi cada 4-5 dies.

## Material i mètodes

Al voltant del dia 21, des del processament de les mostres, els fibroblasts ja van cobrir tota la superfície del pou i del cobreobjectes que es trobava en contacte amb els fragments de pell. Arribat aquest punt, es van poder passar per continuar amb l'expansió. Pel passatge, es va retirar el medi i es van posar 2mL de tampó fosfat salí de Dulbecco (DPBS, L0615-500, Biowest, Nuaille, França) a cadascun dels tres pous de la part inferior de la placa de 6 pous (on no hi havia els fragments de pell) i es van netejar amb 2 mL de DPBS als pous on s'havien cultivat les mostres de pell. Amb l'ajuda d'unes pinces estèrils es van transferir els cobreobjectes als pous de la part inferior de la placa posant la part que havia estat en contacte amb els fragments de pell cap amunt. A continuació, es va aspirar el DPBS i es va afegir 1 mL de *TrypLE Express* (12563-011, Gibco-Thermo Fisher Scientific), una combinació d'enzims que permet dissociar les cèl·lules, prèviament escalfat i es va incubar a 37 °C durant 3 min. Passat el temps, ràpidament es van afegir 2 mL de medi de fibroblast i amb l'ajuda d'un *scraper* es van desenganxar els fibroblasts. Tot el medi amb els fibroblasts desenganxats es va recollir en un tub de 15 mL i es va centrifugar a 1000 rpm durant 4 min. El sobrenedant es va retirar i es van resuspendre els fibroblasts amb medi per fibroblasts fresc i es van transferir a un flascó T75. A partir d'aquest punt, el medi es va canviar dos cops per setmana.

Un cop els fibroblasts van arribar al 95-100% de confluència, es van desenganxar tal com s'ha explicat anteriorment, es van centrifugar a 1000 rpm durant 4 min, es va descartar el sobrenedant i les cèl·lules es van resuspendre amb medi de criopreservació: *Knock-Out Serum Replacement* (KOSR, 10828028, Gibco-Thermo Fisher Scientific) suplementat amb 10% de sulfòxid de dimetil (DMSO, P2650, Merck Life Science, Darmstadt, Alemanya). Les cèl·lules en suspensió es van aliquotar en criovials i es van emmagatzemar dins del contenidor de congelació Mr Frosty (Thermo Fisher Scientific) amb isopropanol (AL03111000, Scharlab, Barcelona, Espanya) a -80 °C per permetre la congelació progressiva dels fibroblasts. L'endemà van ser transferits al tanc de nitrogen líquid per a l'emmagatzematge a llarg termini.



### 2. Reprogramació dels fibroblasts a cèl·lules pluripotents induïdes (iPSC)

Tant la reprogramació dels fibroblasts a iPSC com la caracterització de les línies iPSC obtingudes es va fer al Centre de Medicina Regenerativa de Barcelona. Seguidament, s'expliquen breument els mètodes utilitzats tant per la reprogramació com pels diferents tests per a la caracterització de les línies generades.

#### 2.1. Reprogramació dels fibroblasts per factors episomals a iPSC

Es van separar 500000 fibroblasts i amb el *Kit Amaxa NHDF Nucleofector* i el Nucleofector 2b (VPD-1001, Lonza, Basilea, Suïssa) amb el protocol U-023 es van nucleofectar els vectors episomals codificants pels factors de reprogramació OCT3/4, shRNA contra p53, SOX2, KLF4, L-MYC i LIN28 (#27077, #27078, #27080, Addgene, Watertown, Regne Unit). Com a control positiu i per estimar l'eficiència de nucleofecció, es van nucleofectar 500000 fibroblasts amb un vector codificant per GFP (#27082, Addgene). Després de la nucleofecció ràpidament es van sembrar els fibroblasts en 6 pous de plaques de 6 pous amb recobriment de matrigel (354230, Corning, Corning, NY, EUA) i es van mantenir en medi de fibroblasts. Un cop van arribar a confluència, es van tripsinitzar i es van sembrar 50000 cèl·lules en 6 pous de plaques de 6 pous amb recobriment de matrigel, i es van mantenir amb 50% medi de fibroblasts i 50% TeSR-E7 (05914, StemCell Technologies, Vancouver, Canadà) durant 24 h. Passades les 24 h, es va canviar el medi a TeSR-E7. Entre els dies 15-20 posteriors a la sembra, es va observar l'aparició de colònies iPSC. Aquestes es van recollir manualment i es van cultivar per a la seva expansió.

#### 2.2. Caracterització de les línies iPSC generades

##### 2.2.1. Determinació de la presència de transgens de reprogramació i expressió de factors de transcripció de pluripotència endògens

Per determinar la presència de transgens de reprogramació, es va extreure DNA genòmic de les iPSC i es va fer PCR quantitativa (qPCR) amb encebadors específics contra l'*Epstein-Barr Nuclear Antigen 1 (EBNA1)*, seqüència només present als vectors de reprogramació. Com a control positiu es va utilitzar DNA obtingut de fibroblasts a 72 h després de la nucleofecció.

Per a la mesura de marcadors de pluripotència, es va extreure mRNA de les iPSC utilitzant un protocol basat en l'ús del Trizol (15596026, Invitrogen-Thermo Fisher

## Material i mètodes

Scientific) i es va retrotranscriure 1 µg de mRNA amb el *Kit Clones AMV First-strand cDNA* (12328032, Life technologies-Thermo Fischer Scientific). Les reaccions de qPCR es van fer amb *SyBR Green* (1176202K, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) i encebadors específics per a cada un dels gens (Taula 5). Els valors de Ct es van normalitzar pel percentatge d'expressió de GAPDH.

**Taula 5. Encebadors utilitzats per a la determinació de la presència de vectors episomals de reprogramació i l'expressió dels factors de transcripció de pluripotència.**

Gen	Forward (3'-5')	Reverse (3'-5')
<i>EBNA-1</i>	TGGAAACCAGGGAGGCAAAT	GTCAAGGAGGTTCCAACCCG
<i>Oct3/4</i>	CCCCAGGGCCCCATTTTGGTACC	ACCTCAGTTTGAATGC ATGGGAGAGC
<i>Sox2</i>	TTCACATGTCCCAGCACTACCAGA	TCACATGTGTGAGAGGGGCAGTGTGC
<i>Lin28</i>	AGCCATATGGTAGCCTCATGTCCGC	TCAATTCTGTGCCTCCGGGAGCAGGGTAGG
<i>GAPDH</i>	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC	AGGGATCTCGCTCCTGGAA

### 2.2.2. Cariotip

Les colònies d'iPSC a un 70% de confluència van ser tractades amb colcemida (15210040, *KaryoMAX colcemid*, Gibco-Thermo Fisher Scientific), tripsinitzades i incubades en una solució hipotònica. Seguidament, es van fixar amb solució de Carnoy (75% metanol i 25% àcid acètic). La integritat del genoma de les iPSC es va avaluar analitzant el bandejat G del cariotip en metafase a l'Hospital Sant Joan de Déu mitjançant protocols estàndards.

### 2.2.3. Tinció de la fosfatasa alcalina

Per a la tinció de la fosfatasa alcalina les iPSC, es van fixar amb 4% de paraformaldehid durant 1 min. Es van eliminar les restes de paraformaldehid fent rentats amb DPBS i es van tenyir les iPSC fixades amb el kit de tinció de la fosfatasa alcalina (SCR004, Sigma Aldrich-Merck). Finalment es van fer fotografies en camp clar.

## Material i mètodes

### 2.2.4. Immunofluorescències dels marcadors de pluripotència

Per detectar els marcadors de pluripotència, es van fixar les iPSC amb 4% de paraformaldehid. Es van bloquejar i permeabilitzar amb tampó Tris-Salí (TBS)+ 0.5% Tritó X-100+ 6% de sèrum de ruc. Els anticossos primaris contra els factors de transcripció de pluripotència (Nanog, OCT4, SOX2, TRA-1-81, TRA-1-60, SSEA-3 i SSEA-4) es van incubar tota la nit en TBS+ 0.1% Tritó X-100+ 6% sèrum de ruc (Taula S1). La incubació dels anticossos secundaris es va fer 2 h a 37 °C (Taula S2). Finalment, el nucli es va tenyir amb Dihidroclorur de 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI, 6224, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific). Les imatges es van adquirir amb el microscopi confocal Leica TSC SPE/SP5 (Leica, Wetzlar, Alemanya).

### 2.2.5. Formació dels *Embryoid bodies* i immunohistouímica de marcadors de endoderm, mesoderm i ectoderm

La diferenciació *in vitro* es va fer a través de la formació de cossos embrionaris (EB). Per a l'obtenció d'EB es van desenganxar les colònies d'iPSC i es van transferir a una placa de 96 pous amb medi mTeSR-1 (Stemcell Technologies). Es va centrifugar la placa a 800 g durant 10 min i es va incubar a 37°C i 5%CO<sub>2</sub> durant 24 h. Els EBs formats es van transferir a una placa de baixa adhesió amb mTeSR1 i es van incubar 24 h. Passades les 24 h, els EBs es van transferir en flascons amb cobreobjectes enganxat a la base amb recobriment de matrigel. Es van cultivar amb medi de diferenciació per les tres capes germinals entre 21-28 dies:

- Ectoderm: 50% medi Neurobasal, 50% DMEM/F12, 1% N2, 1% B27, 1% Glutamax i 1% Penicil·lina/estreptomicina.
- Endoderm: Knockout-DMEM, 10% FBS-Hyclone, 1% MEM-NEAA, 0.1% β-mercaptoethanol, 1% Glutamax i 1% Penicil·lina/estreptomicina.
- Mesoderm: Medi d'endoderm suplementat amb 0.5 mM L-Ascorbic acid.

Es van fer immunohistoquímiques amb diferents anticossos específics contra marcadors endodèrmics (AFP i FOXA2), ectodèrmics (TUJ1 i GFAP) i mesodèrmics (ASMA i ASA) tal com s'ha descrit a l'apartat de Mètodes 2.2.4. Els anticossos utilitzats es troben a la Taula

## Material i mètodes

S1 i S2 de l'annex 1. Les imatges van ser adquirides amb el microscopi confocal Leica TSC SPE/SP5 (Leica, Wetzlar, Alemanya).

### 2.3. Seqüenciació de l'exó 13 del gen *RYR2*

Un cop obtingudes i caracteritzades les línies iPSC, es va seqüenciar la regió de l'exó 13 del gen *RYR2* que conté la mutació c.G1069A, per comprovar que durant el procés de reprogramació la mutació s'havia mantingut.

#### 2.3.1. Extracció de DNA genòmic de les iPSC

L'extracció del DNA genòmic de les iPSC es va fer a partir de cèl·lules congelades a -80°C amb el *NucleoSpin Mini Tissue Kit* (740952.50, Machery-Nagel, Allentown, PA, EUA). Les cèl·lules es van llisar amb el tampó T1. Un cop llisades, es va afegir a la mescla el tampó B3 i la proteïnasa K i es va incubar durant 15 min a 70 °C. Seguidament, es va afegir etanol 100% (ET00061000, Scharlab) i es va barrejar enèrgicament amb un vòrtex per afavorir les condicions d'unió del DNA genòmic a les columnes del kit. La mostra es va transferir a les columnes del kit i es va centrifugar 1 min a 11000 g. Un cop unit el DNA a la columna, es van fer dos rentats, un amb el buffer BW i l'altre amb el buffer B5 centrifugant 1 min a 11000 g. Un cop rentada la membrana es va assecar centrifugant 1 min a 11000 g. Es va posar la columna en un nou tub de 1.5 mL i amb el buffer BE es va eluir el DNA genòmic centrifugant 1 min a 11000 g.

El DNA genòmic extret es va analitzar per espectrofotometria amb el *NANODROP-1000* (Thermo Fischer Scientific). La mesura de la concentració es va realitzar a una absorbància (A) de 260 nm, que és la longitud d'ona a la qual absorbeixen els àcids nucleics. Per determinar-ne la qualitat, es van tenir en compte dos ratios. La ratio A260 nm/A280 nm determina la puresa del DNA, la mostra es considera pura si el valor d'aquesta ratio té un valor aproximat a 2. Si la ratio és inferior ens indica la presència de contaminants com proteïnes, les quals absorbeixen a 280 nm. La ratio A260 nm/A230 nm indica com de lliure de contaminants com fenols i alcohols es troba la mostra. Es considera una mostra pura si la ratio es troba al voltant de 2, si és inferior considerem que la mostra conté solvents orgànics que absorbeixen a 230 nm. Les mostres amb bones ratios van ser congelades a -20 °C fins al seu ús.

## Material i mètodes

### 2.3.2. Amplificació, purificació i seqüenciació per Sanger

L'amplificació es va dur a terme amb la reacció en cadena de la polimerasa (PCR) amb encebadors específics per la regió de l'exó 13 del gen *RYR2* (*Forward* CAAGCATAAGTTAGAGGTCG ; *Reverse* GAATCTGCCCTTTCACTTGC). La reacció es va dur a terme amb una mix de volum final 12.5 µL (Taula 6) en plaques de 96 pous amb el termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Waltham, MA, EUA). El perfil d'amplificació es va basar en una desnaturalització inicial del DNA, seguida de 40 cicles de desnaturalització, hibridació i elongació seguit d'una elongació final (Taula 7).

**Taula 6. Components de la mix de PCR.**

Component	Referència	Volum(µL)	Concentració Final
GoTaq G2 Colorless Hot Start Master Mix (2X)	M7432, Promega (Madison, WI, EUA)	6.25	1X
H <sub>2</sub> O <i>Nuclease-Free</i>		4.25	
DNA Genòmic (10 ng/µL)		1	0.8 ng/µL
Encebadors <i>Forward+Reverse</i> (10 µM)	Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, EUA)	1	800 nM
Volum Final		12.5	

**Taula 7. Programa de PCR utilitzat.**

Etap	Temperatura	Temps	Cicles
Desnaturalització inicial	95°C	3 min	1
Desnaturalització	94°C	3 seg	40
Hibridació	60°C	3 seg	
Elongació	72°C	4 seg	
Elongació Final	72°C	5 min	1
Final	4°C	Infinit	1

Per comprovar la correcta amplificació de la reacció es va fer una electroforesi del producte de PCR en un gel d'agarosa al 1.2% (50004, Lonza, Basilea, Suïssa) amb Midori Green Advance 1:40000 (MG04, Nippon Genetics, Tokyo, Japó) i es va visualitzar amb el transiluminador Vilber Lourmat Quantum (Vilber, Marne-la-Vallée, França) i el programa Vision Capture (Vilber).

## Material i mètodes

Els productes correctament amplificats van ser purificats utilitzant l'*ExoZAP* (720010-1000, AMPLIQON, Odense, Dinamarca). Aquest està format per dos enzims, l'exonucleasa I, que elimina les restes d'encebadors, i la *Shrimp Alkaline Phosphatase* que elimina els dNTPS. La reacció es va fer en plaques de 96 pous amb 2.5 µL de producte de PCR i 1 µL d'*ExoZAP*. En un termociclador es va incubar primer 2 min a 37 °C per eliminar les restes de la reacció de PCR i finalment 3 min a 80 °C per inactivar els enzims.

La reacció de seqüència es va fer seguint el mètode de Sanger utilitzant el *BigDye Terminator V3.1* (Applied Biosystems). La reacció es va dur a terme en un volum final de 5 µL en plaques de 96 pous (Taula 8). El perfil usat per a la reacció de seqüència es troba a la Taula 9.

**Taula 8. Components de la reacció del *BigDye*.**

Components	Referència	Volum (µL)	Concentració Final
5X Tampó per seqüenciació		1	1X
<i>BigDye® Terminator v3.1 Ready Reaction Mix</i>	4337456, Applied Biosystems	0.5	1X
Encebador <i>Forward o Reverse</i> (10 µM)	Integrated DNA Technologies	0.5	800 nM
Producte purificat de PCR		1	
H <sub>2</sub> O <i>Nuclease-Free</i>	AM9932, Invitrogen- Thermo Fisher Scientific	2	
Volum Final		5	

**Taula 9. Programa utilitzat per la reacció de *BigDye*.**

Etapa	Temperatura	Temps	Cicles
<b>Desnaturalització Inicial</b>	96°C	1 min	1
<b>Desnaturalització</b>	96°C	10 seg	
<b>Hibridació</b>	50°C	5 seg	25
<b>Elongació</b>	60°C	4 min	
<b>Final</b>	4°C	Infinit	1

Un cop finalitzada la reacció del *BigDye* es va precipitar afegint 80 µL de solució d'etanol 70% (Shcarlab)-acetat sòdic 0.11 M (1.06268.1000, Sigma Aldrich-Merck). Es va incubar durant 12 min a temperatura ambient i seguidament es va centrifugar a 2000 g durant 45 min a 15 °C. Es van eliminar les restes de solució d'etanol-acetat sòdic i es va deixar assecar 10 min a temperatura ambient. Tot seguit es van afegir 150 µL d'etanol al 70% i es va centrifugar a 2000 g durant 10 min. Es van eliminar les restes d'etanol i es va deixar

## Material i mètodes

assecar la placa 10 min a temperatura ambient. Finalment, es va resuspendre el DNA precipitat amb 10 µL de formamida (4311320, Applied Biosystems) i es va incubar 7 min a 95°C.

El producte es va analitzar per electroforesi capil·lar amb el *seqüenciador Genetic Analyzer 3130XL* (Applied Biosystems). Els resultats obtinguts es van analitzar amb el programa *Sequencing Analysis v.5.2* (Applied Biosystems).

### 3. Estudi molecular i funcional del canal RYR2

#### 3.1. Cultius de iPSC

Les línies iPSC generades es van descongelar ràpidament en un bany d'aigua a 37 °C. El contingut del vial va ser recollit amb medi mTeSR1 (85850, Stem Cell Technologies) suplementat amb 10 µM de ROCKi (Y-27632 2HCl, inhibidor de la quinasa ROCK1, S1049, Selleckchem, Houston, TX, EUA), es va transferir a un tub de 15 mL i es van centrifugar 5 min a 200 g. Les iPSC van ser resuspeses amb mTeSR1+ROCKi i es van repartir en 3 pous de plaques de 6 pous recoberts amb matrigel prèviament incubat un mínim de 30 min a 37 °C a dilució 1:48 amb *Knock-Out DMEM* (10829-018, Gibco-Thermo Fisher Scientific). Les iPSC es van mantenir en condicions estàndards de cultiu canviant el medi cada 24 h.

Cada 4-7 dies, les iPSC van ser passades. Per fer el passatge, primer es va fer un rentat amb DPBS i es van incubar durant 5 min a 37 °C amb EDTA 0.5 mM en DPBS (15575-038, Invitrogen-Thermo Fisher Scientific) prèviament escalfat a 37 °C. Passats els 5 min, es va aspirar l'EDTA i es van donar cops suaus als laterals de la placa per afavorir el desprendiment de les iPSC. Les iPSC van ser recollides amb 1 mL de mTeSR1+ROCKi per pou, aquest procediment es va fer dues vegades per pou i totes les cèl·lules van ser recollides en un tub de 50 mL. Les cèl·lules es van comptar amb el *Countess™ II* (Thermo Fisher Scientific) i es van sembrar entre 80000 (8330 cèl·lules/cm<sup>2</sup>) i 300000 (31250 cèl·lules/cm<sup>2</sup>) cèl·lules a 3 pous de plaques de 6 pous amb recobriment de matrigel pel manteniment de les línies. Per a les diferenciacions es van sembrar 80000 (210530 cèl·lules/cm<sup>2</sup>) o 850000 (223680 cèl·lules/cm<sup>2</sup>) cèl·lules, segons la línia cel·lular, a tots els pous de plaques de 12 pous amb recobriment de matrigel.

## Material i mètodes

Per assegurar la disponibilitat de cèl·lules iPSC de cada una de les línies utilitzades, en els primers passatges les iPSC sobrants van ser congelades. Per congelar les iPSC, es van recollir en un tub de 15 mL i es van centrifugar 5 min a 200 g. Es va aspirar el sobrenedant i es va resuspendre el *pellet* de cèl·lules amb el medi de criopreservació descrit abans (90% KOSR i 10% DMSO). Es van al·liquotar en criovials, i es van congelar progressivament fins a -80 °C dins del contenidor MrFrosty ja descrit. Per la conservació a llarg termini de les cèl·lules, l'endemà es van traspasar al tanc de nitrogen.

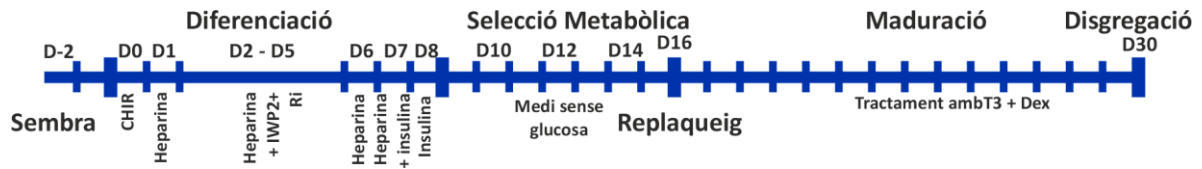
### 3.2. Diferenciació de les iPSC a iPSC-CM

Previ a cada inici de diferenciació, les iPSC es van sembrar en plaques de 12 pous amb recobriment de matrigel. Des del moment de la sembra totes les línies utilitzades van ser mantingudes en cultius durant 2 dies amb medi mTeSR1 abans d'iniciar el procés de diferenciació. El protocol utilitzat consta de tres fases (Figura 15), i va ser el mateix per diferenciar tant les línies dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S com la de l'individu control sa.

La primera fase és el procés de diferenciació d'iPSC a iPSC-CM que comprèn des del dia 0 fins al dia 8 del protocol. Al dia 0 es va canviar el medi mTeSR1 per medi de diferenciació (Taula 10) suplementat amb 4-5  $\mu\text{M}$  de CHIR99021 (S1263, Selleckchem), segons la línia cel·lular. El dia 1 es va canviar el medi per medi de diferenciació suplementat amb 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'heparina (H3149-10KU, Sigma Aldrich-Merck). Dels dies 2 al 5 es va suplementar el medi amb 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'heparina, 3  $\mu\text{M}$  d'IWP2 (3533, Tocris Biosciences, Bristol, Regne Unit) i 10  $\mu\text{M}$  de Rocki. El dia 6 es va suplementar amb 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'heparina. El dia 7 amb 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'heparina i 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'insulina (I9278-5ML, Sigma-Aldrich). Finalment, a dia 8 es va suplementar únicament el medi de diferenciació amb 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  d'insulina.<sup>136</sup> Entre els dies 7 i 10 des de l'inici de diferenciació els iPSC-CM van començar a bategar (Figura 15).



## Material i mètodes



**Figura 15. Protocol de diferenciació optimitzat per a la diferenciació d'ipSC a ipSC-CM.** Representació esquemàtica del protocol de diferenciació utilitzat basat en els protocols de Lin i col·laboradors (2017)<sup>136</sup>, Sharma i col·laboradors (2015)<sup>137</sup> i Parikh i col·laboradors(2017)<sup>149</sup>.

**Taula 10. Composició del medi de diferenciació.**

Composició	Referència	Concentració
DMEM Nutrient Mixture F-12	21331-020, Thermo Fisher Scientific	1X
L-ascorbic acid	A4544-25MG, Sigma-Aldrich	0.064 mg/mL
Selenit de sodi	S5261-10G, Sigma-Aldrich	0.01344 µg/ml
Holo-transferrina	T0655-100MG, Sigma-Aldrich	10 µg/ml
Chemically defined lipid concentrate	11905-31, Thermo Fisher Scientific	1X
Glutamax	35050-061, Gibco-Thermo Fisher Scientific	1%
Penicil·lina/estreptomicina	P4333-100ML, Sigma-Aldrich	1%

La segona fase del protocol de diferenciació comprèn del dia 10 al 16 des de l'inici de la diferenciació. Durant aquesta fase es va aplicar un tractament de selecció metabòlica que constava de medi de manteniment de cardiomiòcits sense glucosa (Figura 15 i Taula 11), per tal de poder eliminar les cèl·lules no diferenciades correctament<sup>137</sup>. Durant aquest procés, el medi es va canviar cada dos dies.

**Taula 11. Composició del medi per a la selecció metabòlica.**

Composició	Referència	Concentració a afegir
SILAC Advanced DMEM/F-12 Flex Media	A24943-01, Thermo Fisher Scientific	
L-àcid ascòrbic	Taula 10	0.0615 mg/ml
Selenit de sodi	Taula 10	0.00844 µg/ml
Holo-transferrina	Taula 10	2.5 µg/ml
<i>Chemically defined lipid concentrate</i>	Taula 10	1x
Glutamax	Taula 10	1X
Penicil·lina/estreptomicina	Taula 10	1X
L-Arginina	88427, Thermo Fisher Scientific	147.5 mg/ml
L-Lisina	88429, Thermo Fisher Scientific	91.25 mg/ml

## Material i mètodes

L'última fase del procés de diferenciació comença a partir del dia 16 i acaba el dia 30. Aquesta fase comença amb el replaqueig dels iPSC-CM. Aquest procés consisteix a dissociar els iPSC-CM i sembrar-los a alta densitat en matrigel fresc, per així generar noves monocapes que augmentin la viabilitat i la maduresa dels iPSC-CM. Després del replaqueig, s'inicia el tractament hormonal de maduració utilitzant T3+Dex.

Per a la dissociació, cada pou de les plaques de diferenciació es va incubar amb 400U/mL de col·lagenasa B (11088807001, Roche, Basilea, Suïssa) durant 30 min a 37 °C. Per afavorir el despreniment de les monocapes, cada 10 min es va colpejar suaument als laterals de la placa. Passats 30 min es van recollir tots els fragments desenganxats en un tub de 15 mL i es van centrifugar 5 min a 200 g. La col·lagenasa B es va retirar i es va afegir tripsina 0.25% (T4049-500ML, Sigma Aldrich-Merck). Es va incubar primer durant 7 min, es va invertir el tub i es va incubar durant 5 min més a 37 °C. Seguidament, es va neutralitzar la tripsina amb medi de disgregació (Taula 12) i amb una pipeta serològica de 10 mL es va fragmentar amb molt de compte els agregats de cèl·lules que encara podien quedar. Es va centrifugar 5 min a 200 g i es van eliminar les restes de medi i tripsina. Les cèl·lules es van resuspendre amb medi de disgregació fresc, es van fer passar per una malla amb porus de 70 µm (*cell strainer*) situat sobre un tub de 50 mL per obtenir cèl·lules individuals. Finalment, es van comptar i es van sembrar al voltant de 2.5 milions de cèl·lules (660000cèl·lules/cm<sup>2</sup>) en nous pous de placa de 12 pous amb recobriment de matrigel fresc.

**Taula 12. Composició del medi de disgregació.**

Composició	Referència	Concentració
Medi de Diferenciació	Taula 10	1X
Insulina		10 µg/mL
Dex	1126, Tocris Bioscience	1 µM
T3	T2877-100MG, Sigma Aldrich-Merck	0.1 µM
Sèrum fetal boví (FBS)	10270-106, Gibco-Thermo Fisher Scientific	20%

Es van mantenir els iPSC-CM fins a dia 30 amb medi de diferenciació suplementat amb insulina i T3+Dex (Taula 13) canviant el medi diàriament o cada dos dies. Un cop arribat a dia 30, els iPSC-CM es van disgregar seguint el mateix protocol utilitzat pel replaqueig i es van sembrar els iPSC-CM a cambres de registre pels estudis funcionals amb

## Material i mètodes

recobriments de gelatina 0.1% en DPBS (G1393-20ML, Sigma Aldrich-Merck) o es van recollir pels posteriors estudis moleculars.

**Taula 13. Composició del medi de maduració els iPSC-CM.**

Composició	Referència	Concentració
Medi de Diferenciació	Taula 10	1X
Insulina		10 µg/mL
Dex	Taula 12	1 µM
T3	Taula 12	0.1 µM

### 3.3. Anàlisi d'expressió de marcadors de cardiomiòcits per immunofluorescència

Aproximadament 150000 iPSC-CM disgregats a dia 30 van ser sembrats sobre cobreobjectes de 12 mm pretractats amb gelatina 0.1% en DPBS. Passats 3-4 dies des de la disgregació, es van fer quatre rentats amb DPBS fred i es van fixar amb metanol (ME03022500, Scharlab, Sentmenat, Espanya), prèviament refredat a -20 °C, durant 10 min a -20°C. Es van fer 3 rentats amb DPBS fred i es van bloquejar i permeabilitzar a la vegada amb la solució PFS (Taula 14) durant 30 min a 37 °C. Es van fer cinc rentats amb DPBS i es va incubar tota la nit a 4 °C en una cambra humida amb l'anticòs primari diluït en la solució PFS (Taula 15).

**Taula 14. Composició de la solució PFS.**

Composició	Casa Comercial	Concentració
Saponina	47036-50G-F, Sigma-Aldrich	0.0025%
Gelatina de pell de peix d'aigües fredes	G7765-250ML, Sigma-Aldrich	0.7%
Azida sòdica	Sigma-aldrich	0.02%
PBS-	Taula 18	

**Taula 15. Anticòssos utilitzats per a les immunofluorescències dels marcadors de cardiomiòcits.**

Anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti- $\alpha$ -actinina	A7811, Sigma-Aldrich	1:200
Anti-troponina T	bs-10648R, Bioss Antibodies, Woburn, MA, EUA	1:200

L'endemà es van fer 4 rentats de 5 min amb PFS, i es va posar l'anticòs secundari a dilució 1:400 en PFS (Taula 16) i es va incubar 1 h a temperatura ambient a una cambra humida en fosc. Es van fer tres rentats de 5 amb PBS-. Es va incubar amb 0.4 µg/mL de DAPI 5 min a temperatura ambient a la cambra humida i en fosc per tenyir el DNA. Els

## Material i mètodes

cobreobjectes es van rentar amb aigua milliQ i es va fer el muntatge amb el medi de muntatge *FluorSave* (345789-20ML, Calbiochem, San Diego, CA. EUA). Les imatges de les immunofluorescències es van adquirir amb el microscopi Nikon Eclipse 50i (Nikon, Tokio, Japó) i el programa NIS Element (Nikon).

**Taula 16. Anticossos secundaris utilitzats per a les immunofluorescències dels marcadors de cardiomiòcits.**

Anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti-conill Alexa Fluor 488	A11008, Thermo Fisher Scientific	1:400
Anti-ratolí Alexa Fluor 488	A28175, Thermo Fisher Scientific	1:400

### 3.4. Anàlisi d'expressió per Western Blot

#### 3.4.1. Extracció i quantificació de les proteïnes dels iPSC-CM

Per a l'extracció de les proteïnes d'iPSC-CM, primer es van fer dos rentats amb DPBS fred i es van llisar les cèl·lules amb tampó de lisi (Taula 17) suplementat amb la barreja d'inhibidors de proteases *cOmplete Mini EDTA-Free* (11836170001, Roche) i d'inhibidors de fosfatases *PhosStop* (04906837001, Roche) amb l'ajuda d'un *scraper*. Un cop recollides les mostres, van ser sonicades amb un sonicador manual Labsonic M (Sartorius, Göttingen, Alemanya) per fragmentar la cromatina i reduir-ne la viscositat.

**Taula 17. Composició del tampó de lisis per a l'extracció de proteïna.**

Composició	Casa Comercial	Concentració
Sodi dodecil sulfat(SDS)	75746-1KG, Sigma Aldrich-Merck	2%
Glicerol	1.04093.1000, Sigma Aldrich-Merck	10%
Tris-HCl pH 6.8	T6066-1KG, Sigma Aldrich-Merck	50 mM

Per a la quantificació de proteïna es va utilitzar l'assaig de l'àcid bicinonínic (BCA Assay Kit, 23225, Thermo Fisher Scientific). Primer es va fer una corba de calibració a una placa de 96 pous a partir d'albumina sèrica bovina (BSA), en la qual es van carregar quantitats de BSA conegudes (en µg: 1,2,3,5,7,9 i 10). Seguidament, a la mateixa placa de la corba de calibració, es van carregar per triplicat les mostres fent una barreja de 22.5 µL d'aigua i 2.5 µL de mostra. Tant a les mostres com a la recta patró es van afegir 200 µL del reactiu de BCA i es va incubar a 37 °C durant 30 min. Després es va llegir l'absorbància a 562 nm

## Material i mètodes

amb un lector de plaques *Cytation 5 imaging reader* (BioTek, Winooski, VT, USA) i es va calcular la concentració de proteïna de les mostres segons els valors de la corba de calibració.

### 3.4.2. Electroforesi desnaturalitzant en SDS-acrilamida i Western Blot

Per a totes les mostres, es va preparar una barreja de 15 µg de proteïna total, aigua i tampó de càrrega 4X (1610747, BioRad, Hercules, CA, EUA) suplementat amb 10% β-mercaptoetanol (M3148-25ML, Sigma Aldrich, Merck). Les mostres es van bullir 5 min a 95 °C, per desnaturalitzar les proteïnes, i es van centrifugar 1 min a 16.000 g. Les mostres de proteïna juntament amb el marcador de pes molecular *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder* (26619, Thermo Fisher Scientific) van ser separats mitjançant una electroforesi desnaturalitzant en SDS-acrilamida en gels *TGX™ FastCast™ Acrylamide Kit al 7.5%* (1610181, BioRad). Aquesta acrilamida conté un compost trihalo que s'uneix als triptòfans de les proteïnes, permetent la seva visualització, fotodocumentació i seguiment.

La separació de proteïnes es va fer en tampó d'electroforesi 1X (Taula 18) en dues fases. Primer es va aplicar un voltatge de 80 V durant 15 min per permetre l'entrada de les proteïnes al gel apilador, i després es va pujar a 180 V durant 45 min per a la separació total de les proteïnes. Un cop separades les proteïnes, es va desmuntar el gel i es va exposar durant 45 seg a llum UV amb el sistema fotodocumentador *ChemiDoc MP* (BioRad) per permetre que el compost trihalo s'unís als triptòfans de les proteïnes. Després, d'obtenir imatges del gel, les proteïnes van ser transferides a una membrana de PVDF (88518, Thermo Fisher Scientific) amb tampó de transferència 1X (Taula 18) a un voltatge constant de 90 V durant 2 h a 4 °C a una membrana. Acabada la transferència es va adquirir una imatge de la membrana la qual va servir com a referència de proteïna total per a la quantificació i normalització.

## Material i mètodes

**Taula 18. Composició de tots els tampons utilitzats pel western blot.** Tots els reactius són de Sigma Aldrich-Merck excepte els indicats.

Tampó	Composició
Tampó d'electroforesi 10X	25 mM Tris base (T6066-1KG); 192 mM Glicina (G7126-5KG); 0.1% SDS
Tampó de transferència 10X	25 mM Tris base, 192 mM Glicine
Tampó de transferència 1X	10% Tampó de Transferència, 20% Metanol, 0.05% SDS
Tampó Fosfat Salí (PBS <sup>-</sup> ) 10X	26.8 mM KCl (P9541-1KG), 14.7 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (P5655-500G), 1.37 mM NaCl (31434-1KG), 0.8 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (132656.1211, PanReac Applichem, Darmstadt, Germany)

La membrana es va bloquejar durant 1 h amb llet al 5% (06-019-500, Scharlab) en PBS- amb 0.1% Tween-20(PBST, P1379-500ML, Sigma Aldrich-Merck) a temperatura ambient i posteriorment es va incubar amb els anticossos primaris (Taula 19) preparats en solució d'anticòs (Taula 20) a 4 °C en rotació O/N.

**Taula 19. Anticossos utilitzats en els experiments de western blot.**

Anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti-RYR2	NBP1-19484, Novus Biologicals-Biotechnne, (Abingdon, Regne Unit)	1:1000
Anti- $\alpha$ -actinina	A7811, Sigma Aldrich-Merck	1:1000
Anti-troponina T	bs-10648R, Bioss Antibodies(Woburn, MA, EUA)	1:500

**Taula 20. Composició de la solució per a la preparació i incubació del anticòs primari.**

Composició	Casa Comercial	Concentració
BSA	A9647-500G, Sigma Aldrich-Merck	1%
Azida Sòdica	S2002, Sigma Aldrich-Merck	0.02%
PBS <sup>-</sup>	Taula 16	1X

L'endemà es va recuperar l'anticòs primari i es van fer dos rentats de 5 min en agitació amb PBST i dos amb PBS<sup>-</sup>. Es va incubar amb l'anticòs secundari conjugat amb l'enzim HRP (*horse radish peroxidase*) diluït 1:10000 en llet al 3% en PBST en agitació a temperatura ambient (Taula 21). Es va rentar la membrana dues vegades amb PBST i dues amb PBS<sup>-</sup> durant 5 min en agitació a temperatura ambient per eliminar les restes d'anticòs secundari.

## Material i mètodes

**Taula 21. Anticossos secundaris utilitzats per a western blot.**

Anticòs	Casa Comercial	Dilució
Anti conill-HRP	111-035-003, Jackson ImmunoResearch	1:10000
Anti ratolí-HRP	115-035-003, Jackson ImmunoResearch	1:10000

El revelat es va fer per quimioluminescència utilitzant el substrat per l'enzim HRP *Clarity ECL* (170-5061, Biorad). Les imatges van ser adquirides amb el sistema *ChemiDoc MP* (BioRad) i analitzades amb el programa *ImageLab* (Biorad). La intensitat òptica de cada una de les bandes va ser normalitzada per la densitat òptica de la respectiva proteïna total. Per reduir la variabilitat entre experiments, el valor normalitzat de cada mostra va ser dividit per la suma de totes les mostres dins de cada experiment tal com descriuen Degasperi i col·laboradors (2014).<sup>181</sup> Els nivells de RYR2 es van normalitzar per la mitjana geomètrica de la normalització respecte la troponina T i  $\alpha$ -actinina, per així reduir la variabilitat introduïda per l'eficiència de les diferenciacions independents.

### 3.5. Anàlisi d'expressió per PCR quantitativa (qPCR)

#### 3.5.1. Extracció de RNA, quantificació i integritat

L'extracció d'RNA de les mostres d'iPSC i iPSC-CM es va fer seguint el mètode convencional basat en l'ús de fenols i cloroform. Tant les iPSC com els iPSC-CM a dia 30 van ser rentats amb DPBS fred dues vegades i van ser lisats directament a la placa amb 1 mL de *Qiazol lysis reagent* (79306, Qiagen, Hilden, Alemanya). Les mostres recollides van ser guardades a -80 °C fins al seu processament. Per poder prosseguir amb l'extracció d'RNA les mostres van ser descongelades en gel. Un cop descongelades es van deixar 5 min a temperatura ambient i seguidament es van afegir 200  $\mu$ L de cloroform (C2432-25ML, Sigma Aldrich-Merck). Es van barrejar amb un vòrtex durant 45 seg, es van deixar 10 min a temperatura ambient i es van centrifugar durant 15 min a 12000 g a 4 °C. La fase superior transparent va ser transferida a un nou tub, on es van afegir 500  $\mu$ L d'isopropanol per precipitar l'RNA. Es va invertir el tub 3-4 vegades i es va deixar 10 min a temperatura ambient. Les mostres es van centrifugar 10 min a 12000 g a 4 °C. El *pellet* resultant, va ser rentat cinc vegades amb 500  $\mu$ L d'etanol 70% en aigua DEPC (AM9922, Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) i centrifugant 10 min a 12000 g a 4°C. Un cop finalitzats els rentats es va deixar assecar el *pellet* a 55°C fins que perdés les

## Material i mètodes

restes d'alcohols i es tornés transparent. Finalment, l'RNA és va resuspendre amb 30 µL d'aigua lliure de RNases (Qiagen) incubant 10 min a 55 °C.

L'RNA obtingut es va quantificar amb el *NANODROP-1000*. Tal com s'ha descrit abans pel DNA, la mesura de concentració es va realitzar a una absorbància de 260 nm, i per a determinar la qualitat també es van tenir en compte les ratios A260 nm/A280 nm i A260 nm/A230 nm. En cas d'obtenir valors de la ratio A260/A230 inferiors a 1.5, les mostres d'RNA es van precipitar per tal d'eliminar les traces de solvents orgànics i millorar-ne la qualitat. Per precipitar l'RNA, es van afegir 0.1 volums de sodi acetat 3M (AM9740, Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) i 3 volums d'etanol 100% fred a la mostra. Es van barrejar amb un vòrtex i es van deixar 2 h a -20 °C. Seguidament, es van centrifugar a 12000 g a 4 °C durant 15 min. El pellet format es va rentar 5 vegades amb 500 µL d'etanol 75% i centrifugant a 4°C durant 10 min. Finalment, es van eliminar totes les restes d'etanol i es van assecar les mostres a 55 °C fins que el pellet es va tornar transparent. Es van resuspendre amb 30 µL d'aigua lliure de RNases incubant 10 min a 55 °C

La integritat de l'RNA es va avaluar amb el sistema *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, CA, USA) i el *Kit RNA 6000 Nano* (5067-1511, Agilent Technologies). Primer, es van centrifugar 550 µL de la matriu (*RNA 6000 Nano Matrix*) en una columna amb filtre, proporcionada en el kit, a 1500 g durant 10 min a temperatura ambient. Seguidament, es va temperar el colorant concentrat (*RNA 6000 Nano Dye Concentrate*) durant 30 min. Passats els 30 min es va agitar amb un vòrtex i es va barrejar 1 µL d'aquest colorant concentrat amb 65 µL de la matriu prèviament preparada. Es va barrejar tot amb un vòrtex i es va centrifugar durant 10 min a 13000 g. Un cop preparada la matriu amb el colorant, ja es va poder procedir amb la preparació del xip.

El xip es va col·locar a l'estació de muntatge situant la base en posició C i el clip a la posició superior. Un cop situat el xip, es van posar 9 µL de matriu al pou marcat amb la G (negre). Es va tancar l'estació de muntatge i es va prémer suaument l'èmbol fins a subjectar-lo amb el clip. Es van esperar 30 seg i es va alliberar l'èmbol deixant que retornés a la seva posició inicial. Seguidament, es van afegir 9 µL més de matriu als altres dos pous marcats amb G, i es van afegir 5 µL de RNA 6000 Nano Marker als 12 pous de les mostres i al pou del marcador (Figura 16). Es va carregar 1 µL de mostra d'RNA



## Material i mètodes

ajustada entre 5 i 500 ng/ $\mu$ L i 1  $\mu$ L del marcador, desnaturalitzats prèviament a la càrrega a 70 °C durant 2 min. Es va barrejar el xip amb un vòrtex horitzontal 1 min (IKA, Staufen, Alemanya) i es va introduir al *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies).

Per analitzar la integritat de les mostres aquestes seran passades a través dels microcapilars del *2100 Bioanalyzer*. Gràcies als marcadors intercalants fluorescents es podrà fer un seguiment de la separació electroforètica dels fragments segons la seva mida i es podran generar els electroferogrames, les imatges representatives d'un gel amb el patró de bandejat, es podrà calcular la concentració, la ratio dels RNA ribosòmics 28S/18S i el nombre d'Integritat de l'RNA (RIN). El RIN és el valor de més interès que ens proporciona el *2100 Bioanalyzer*. Aquest es calcula amb un algoritme que comprèn les integritats de 1300 mostres d'RNA de diferents teixits i de tres espècies de mamífers diferents (rata, ratolí i humà), per categoritzar les mostres analitzades entre els valors de l'1 al 10. Quant més proper sigui el RIN a 10, més íntegre i de bona qualitat serà la mostra d'RNA. Si pel contrari el RIN de la mostra és proper a 1, la mostra serà de mala qualitat i mostrarà una alta degradació.<sup>182</sup> Les mostres amb un RIN entre 7 i 10 van ser considerades suficientment íntegres per poder ser utilitzades per l'anàlisi d'expressió mitjançant qPCR.

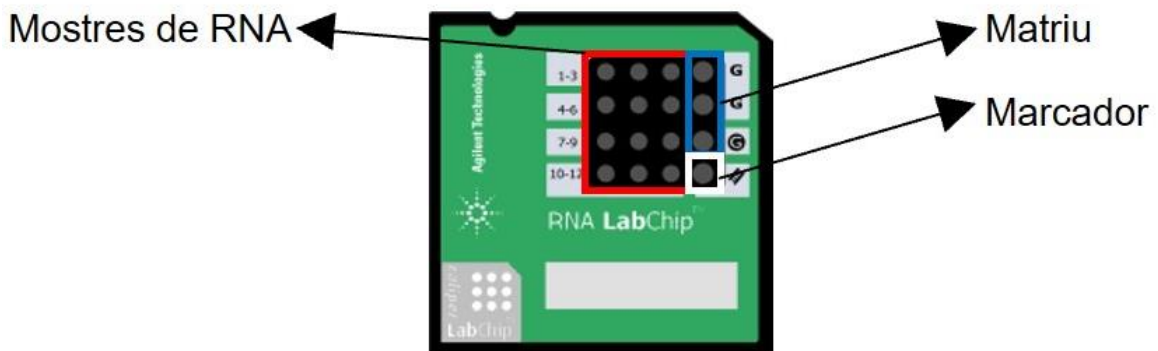


Figura 16. Xip del Kit Bioanalyzer RNA 6000 Nano.

### 3.5.2. Retrotranscripció de les mostres de RNA a DNA complementari (cDNA)

Les mostres d'RNA van ser retrotranscrites a cDNA utilitzant el kit *QuantiTect Reverse Transcription* (205313, Qiagen). Per a totes les mostres, es van retrotranscriure 1  $\mu$ g d'RNA total. En una placa de 96 pous es va preparar una mescla de volum total de 12  $\mu$ L combinant 1  $\mu$ g d'RNA total i H<sub>2</sub>O lliure de RNases. A aquesta mescla es va afegir 2  $\mu$ L de

## Material i mètodes

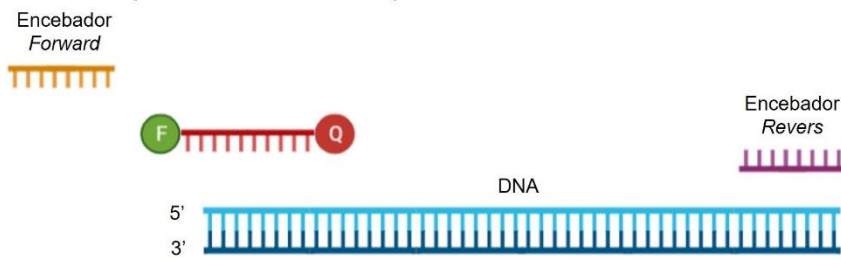
tampó *gDNA WipeOut 7x*. Tot el conjunt va ser incubat a 42 °C durant 2 min en un termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* per eliminar les restes de DNA genòmic. Seguidament, es van afegir 6 µL de mix de retrotranscripció formada per 4 µL de *Quantiscript RT Buffer 5x*, 1 µL de *Quantiscript® Reverse Transcriptase* i 1 µL de *RT Primer Mix*. Tota la mescla es va incubar 15 min a 42 °C, per a la síntesi del cDNA, i 3 min a 95° C per a la inactivació de la retrotranscriptassa. Acabada la retrotranscripció, la mostra es va diluir amb 20 µL de H<sub>2</sub>O lliure de RNases per obtenir cDNA a 25ng/µL.

### 3.5.3.qPCR

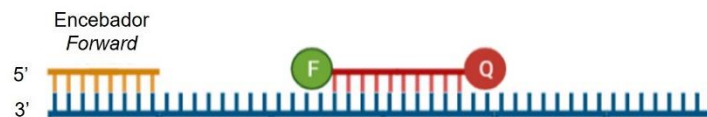
Per a la mesura d'expressió dels diferents gens d'interès, es va utilitzar la tecnologia TaqMan. Aquesta tecnologia es basa en l'ús d'una sonda complementària a la regió a amplificar, la qual conté una fluoròfor en un extrem i un *quencher* a l'altre. Un cop comença a créixer l'amplicó des dels encebadors i s'arriba a la regió on ha hibridat la sonda TaqMan, l'activitat exonucleasa de la polimerasa trencarà la sonda separant el fluoròfor del *quencher*. Aquest podrà ser detectat i a mesura que augmenten els cicles de qPCR la quantitat de fluoròfor alliberat augmentarà. Aquest augment de fluorescència serà seguit a cada cicle per realitzar la quantificació relativa d'mRNA inicial a la mostra (Figura 17).

## Material i mètodes

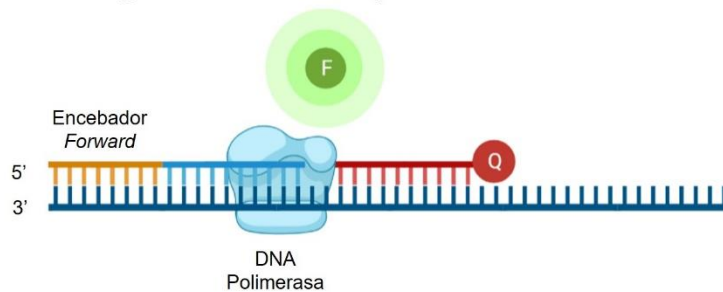
### 1. Components necessaris per la reacció.



### 2. Desnaturalització del DNA i unió dels encebadors i sondes a les seqüències complementàries.



### 3. Polimerització i generació de la senyal



**Figura 17. Representació esquemàtica del funcionament de les sondes TaqMan per a la mesura d'expressió.** "F" indica el fluoròfor de la sonda TaqMan i "Q" representa el *quencher*. A l'hibridar l'encebador *forward* la DNA polimerasa inicia la síntesi de la nova cadena i quan arriba a la zona d'hibridació de la sonda TaqMan, per l'activitat exonucleasa, allibera el fluoròfor que podrà emetre fluorescència.

La reacció de qPCR es va fer per triplicat per mostra i gen en un volum final de 10 µL (Taula 22) en plaques de 384 pous en un *QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems). Per a cada un dels gens d'interès es va fer servir una sonda TaqMan (Taula 23). Com a normalitzador es va utilitzar el gen *PPIA*. A la Taula 24 es mostra perfil utilitzat per a la reacció.

## Material i mètodes

**Taula 22. Components de la reacció de qPCR.**

Component	Referència	Volum( $\mu$ L)	Concentració Final
TaqMan Fast Advanced Master Mix (2X)	4444557, Applied Biosystems	5	1X
H <sub>2</sub> O <i>Nuclease-Free</i>	AM9932, Thermo Fisher Scientific	3.5	
cDNA (25 ng/ $\mu$ L)		1	25 ng
Sonda Taqman (20X)	Taula 21	0.5	1X
Volum Final		10	

**Taula 23. Sondes TaqMan utilitzades per a la mesura d'expressió de cada un dels gens d'interès.** Totes les sondes TaqMan són de Applied Biosystems.

Gen	Proteïna Codificant	Codi de la sonda
<i>RYR2</i>	Receptor de rianodina tipus 2	Hs00181461_m1
<i>ADRB1</i>	Receptor $\beta$ -adrenèrgic tipus 1	Hs02330048_s1
<i>ADRB2</i>	Receptor $\beta$ -adrenèrgic tipus 2	Hs00240532_s1
<i>ACTN2</i>	$\alpha$ -actinina	Hs00153809_m1
<i>ATP2A2</i>	Transportador de Ca <sup>2+</sup> del reticle sarcoplasmàtic/endoplasmàtic dependent de ATP	Hs00544877_m1
<i>SLC8A1</i>	Intercanviador sodi/calci 1	Hs01062258_m1
<i>NANOG</i>	Nanog	Hs02387400_g1
<i>SOX2</i>	Sox2	Hs04234836_s1
<i>POU5F1</i>	Oct3/4	Hs00999632_g1
<i>CACNA1C</i>	Subunitat $\alpha$ del canal de calci tipus L dependent de voltatge	Hs00167681_m1
<i>PLN</i>	Fosfolamban	Hs00160179_m1
<i>CAMK2A</i>	Quinasa dependent de calmodulina II	Hs00947041_m1
<i>FKBP1B</i>	FKBP12.6	Hs00997683_m1
<i>TNNT2</i>	Troponina T	Hs00943911_m1
<i>PPIA</i>	Ciclofilina A	Hs99999904_m1

**Taula 24. Programa utilitzat per a la reacció de qPCR.**

Etap	Temperatura	Temps	Cicles
Incubació amb UNG	50°C	2 min	1
Activació de la polimerasa	95°C	2 min	1
Desnaturalització	95°C	1 seg	40
Hibridació i elongació	60°C	20 seg	
Final	4°C	Infinit	1

## Material i mètodes

La mitjana d'expressió dels triplicats experimentals (Ct) de cada una de les mostres per cada un dels gens, es va normalitzar per l'expressió mitjana dels triplicats experimentals del gen normalitzador *PPIA* ( $\Delta Ct$ ). Amb el càlcul  $2^{-\Delta Ct}$  es va obtenir el nivell d'expressió de cada un dels gens.

Els nivells d'expressió ( $2^{-\Delta Ct}$ ) de *ADRB1*, *ADRB2*, *ATP2A2*, *CANCA1C*, *CAMK2A*, *FKBP1B*, *PLN*, *RYR2* i *SLC8A1* van ser normalitzats pels nivells d'expressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* de forma independent. Finalment, es va fer la mitjana geomètrica de les dues normalitzacions per així reduir la variabilitat introduïda per l'eficiència de les diferenciacions independents.

### 3.6. Preparació del iPSC-CM per citometria de flux

Entre els dies 15-16 postinici de diferenciació, els iPSC-CM van ser dissociats seguint el protocol de replaqueig explicat anteriorment. Després del recompte, es van fer aliquotes de 500000 cèl·lules per cada condició experimental. Es van centrifugar a 1800 rpm durant 5 min i amb molt de compte es va retirar el sobrenedant. Seguidament, es van fixar amb 500  $\mu$ L de 1% paraformaldehid (158217, Sigma Aldrich-Merck) en DPBS durant 10 min a temperatura ambient en rotació. Un cop fixades, es van centrifugar a 1800 rpm durant 5 min a 4 °C. Es va eliminar el sobrenedant i es va fer un rentat amb 500  $\mu$ L de DPBS centrifugant 5 min a 4 °C a 1800 rpm. Seguidament, es van resuspendre les cèl·lules amb la solució de permeabilització i bloqueig (Taula 25), i es van incubar 30 min en rotació a temperatura ambient. Per a la incubació amb l'anticòs primari (Taula 26) es van preparar 200  $\mu$ L d'anticòs en solució de bloqueig i permeabilització i es va incubar durant 45 min a temperatura ambient en rotació.

**Taula 25. Composició de la solució de permeabilització i bloqueig.**

Component	Casa Comercial	Concentració
FBS	Taula 12	20%
Tritó X-100	T9284-1L, Sigma Aldrich-Merck	0.1%
DPBS		1X

**Taula 26. Anticòsos utilitzats per a la citometria dels iPSC-CM.**

Anticòs Primari	Casa Comercial	Dilució
$\alpha$ -actinina	A7811, Sigma-Aldrich	1:100
Troponina T	bs-10648R, Bioss	1:200

## Material i mètodes

Seguidament, es va fer un rentat amb 500 µL de solució de permeabilització i bloqueig. Pel marcatge amb l'anticòs secundari, es va incubar amb l'anticòs secundari (Taula 27) 30 min a temperatura ambient en fosc i en rotació. Finalment, es va centrifugar a 1800 rpm durant 5 min, es va fer un rentat i es va resuspendre la mostra en un volum final de 200 µL de DPBS+20% FBS. Les mostres van ser analitzades amb el citòmetre *BD Accuri C6 Flow Cytometer* (BD Biosciences, MA, USA).

**Taula 27. Anticòsos secundaris utilitats per citometria de flux dels iPSC-CM.**

Anticòs Primari	Casa Comercial	Dilució
Anti-conill Alexa Fluor 488	A11008, Thermo Fischer Scientific	1:1000
Anti-ratolí Alexa Fluor 647	A21236, Thermo Fischer Scientific	1:1000

El citòmetre *BD Accuri C6 Flow Cytometer* està equipat amb un làser de llum blava (488 nm), un làser de llum vermella (640 nm), dos detectors de dispersió de la llum i quatre detectors de fluorescència. Quan una partícula o cèl·lula travessa el feix de llum, es mesura simultàniament la dispersió generada per la seva mida amb el detector frontal *Forward scatter (FSC)* i la dispersió de la llum generada per la complexitat de la partícula amb el detector lateral *Side Scatter (SSC)*. Amb aquestes mesures es genera un gràfic de dispersió on es representen ambdós paràmetres obtinguts per cada partícula per tal de definir la mida i la complexitat de la població de cèl·lules analitzades. Mitjançant aquest gràfic, es seleccionarà la regió d'interès o *gate* a la població de cèl·lules a analitzar, exclouent debris i conglomerats. La fluorescència emesa per les cèl·lules al passar pels làsers excitadors serà captada pels diferents detectors donant un valor de fluorescència a cada una de les cèl·lules.

Per determinar quin nombre de cèl·lules eren positives pel marcatge, vàrem imposar el llindar mínim de fluorescència a partir de les dades obtingudes d'iPSC sense diferenciar. Amb aquestes dades es va avaluar el percentatge de cèl·lules no marcades, positives per troponina T, positives per  $\alpha$ -actinina i cèl·lules amb marcatge d'ambdues proteïnes a les mostres d'iPSC-CM amb el programa *FCS Express 7* (De Novo Software, Pasadena, CA, EUA).

### 3.7. Caracterització funcional del canal RYR2 en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic

Els iPSC-CM es van disgregar a dia 30-32 postinici de diferenciació i es van sembrar en cambres de registre (BT-CS, Cell Microcontorls, Northfolk, VA, USA) amb un recobriments de 0.1% gelatina. Els iPSC-CM es van mantenir durant 2-3 dies abans de fer els registres. Previ a l'inici dels experiments els iPSC-CM es van carregar amb l'indicador de  $Ca^{2+}$  fluorescent *fluo-4-acetoxymethyl ester o Fluo4-AM* (F14201, Invitrogen-Thermo Fischer Scientific) a 5  $\mu$ M en presència d'àcid plurònic 0.02% (P2443-250G, Sigma Aldrich-Merck) en solució fisiològica NK (Taula 28) a pH 7.4 amb NaOH 1M (S8045-500G, Sigma Aldrich-Merck) durant 30 min a temperatura ambient. L'excés de colorant es va eliminar amb rentats de NK, i es van muntar les cambres de registre a l'adaptador pel microscopi invertit *Nikon Eclipse Ti* (Nikon).

**Taula 28. Composició de la solució fisiològica NK**

Component	Casa Comercial	Concentració (mM)
NaCl	Taula 18	140
KCl	Taula 18	3
HEPES	H3375-500G, Sigma Aldrich-Merck	10
MgCl <sub>2</sub>	M1028-100ML, Sigma Aldrich-Merck	1.2
CaCl <sub>2</sub>	2115-100ML, sigma Aldrich-Merck	1.8
Glucosa	G7528-1KG, Sigma Aldrich-Merck	10

Els registres de  $Ca^{2+}$  intracel·lular es van fer amb perfusió global contínua de solució NK mantinguda entre 35-37 °C amb el sistema de control de temperatura *TC<sup>2</sup> bip Bipolar Temperature Controller* (Cell Microcontrols). L'adquisició de les imatges es va fer amb la càmera multiplicadora d'electrons CCD (Hamamatsu C900-13, Hamamatsu, Japan) amb l'objectiu *Plan Fluo 10X*, per tal de poder fer una mesura a nivell poblacional (50-200 cèl·lules per camp). La llum d'excitació i els obturadors es troben integrats dins el sistema d'il·luminació *Lambda DG4* (Sutter Instruments, Novato, CA). L'adquisició de les imatges i la selecció de les regions d'interès (ROI) es va fer amb el programa *MetaFluor Imaging System* (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). El processament dels registres de fluorescència vs. temps obtinguts de cada una de les ROI es va fer amb el programa *pCLAMP* (Molecular Devices).

## Material i mètodes

### 3.7.1. Corbes concentració-resposta de cafeïna en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic

Per als experiments de concentració-resposta de cafeïna dels iPSC-CM, les cèl·lules es van perfondre de forma global amb solució NK entre 35-37 °C. Les diferents concentracions de cafeïna (en mM: 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 5 i 10; C8960-250G, Sigma Aldrich-Merck) es van aplicar de forma local utilitzant un la pipeta de perfusió de vuit canals *MPRE8* (Cell Microcontrols). Amb l'ajuda d'un sistema de perfusió per gravetat amb vàlvules controlades digitalment *cFlow* (Cell Microcontrols) es van aplicar canvis de solucions ràpids de 1 seg de durada entre la solució control i cada una de les concentracions de cafeïna. Pel cas dels experiments en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, es van suplementar les vuit solucions dels vuit canals de la pipeta local *MPRE8* (solució control i les 7 de cafeïna) amb 100 nM d'isoproterenol (ISO 100 nM, I6504-500MG, Sigma Aldrich-Merck).

L'adquisició de les imatges es va fer a una freqüència de 5 Hz. De mitjana es van analitzar entre 50-200 cèl·lules per cada un dels registres. Les corbes concentració-resposta es van obtenir ajustant la funció de Hill a les amplituds mitjanes dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per cada una de les concentracions de cafeïna normalitzats per l'amplitud del transitori induït per cafeïna 10 mM. La funció de Hill comprèn els paràmetres següents:

$$E = \frac{E_{max} [Caff]^n}{(EC50)^n + [Caff]^n}$$

Els paràmetres que comprenen aquesta equació són l' $E_{max}$  que és el pendent màxim de la corba.  $EC50$  o  $K_d$ , representa la concentració de cafeïna necessària per obtenir el 50% de la resposta total.  $n$  és el coeficient de Hill.  $[Caff]$  és la concentració de cafeïna.

### 3.7.2. Transitoris de $\text{Ca}^{2+}$ induïts per un pols de 10 mM de cafeïna en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic

Per a l'anàlisi de la cinètica dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per polsos d'1 seg de cafeïna 10 mM els iPSC-CM es van perfondre de manera global amb NK entre 35-37 °C. L'aplicació del pols de cafeïna 10 mM es va fer tal com s'ha explicat per a les corbes de concentració-resposta de cafeïna. En el cas dels experiments en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, es va suplementar la solució control i la de cafeïna 10 mM de la *MPRE8* amb



## Material i mètodes

ISO 100 nM. Abans d'iniciar els registres en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, es va aplicar NK amb ISO 100 nM durant 2 min.

L'adquisició de les imatges es va fer amb un objectiu *Plan Fluo 10X* a una freqüència de 32 Hz. Dels transitoris registrats es van analitzar l'amplitud del transitori, el temps d'alliberació entre el 10-90%, el temps de recaptació en el 50-10% i 90-10%, i la durada al 50% del transitori (Figura 18).

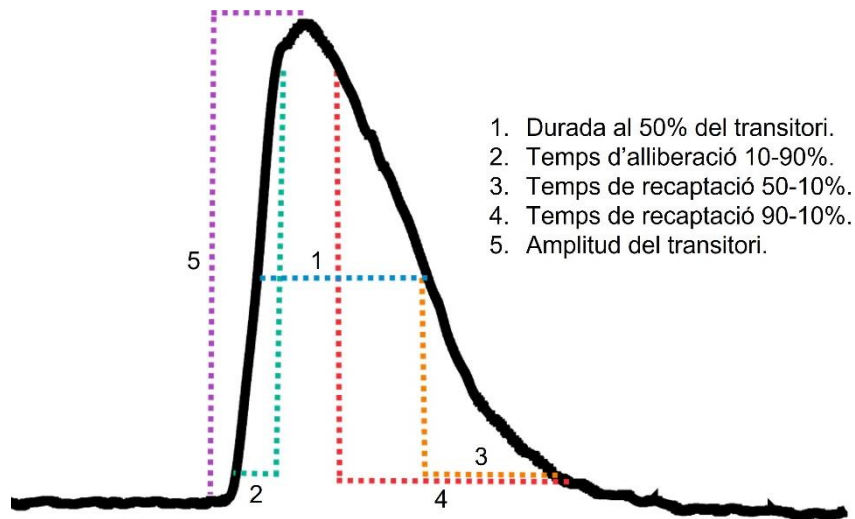


Figura 18. Paràmetres mesurats per a cada un dels transitoris de  $Ca^{2+}$ .

### 3.7.3. Transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals i d'estrès $\beta$ -adrenèrgic

Pels registres de transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp es van perfondre els iPSC-CM amb NK entre 35-37 °C. Per induir els transitoris de  $Ca^{2+}$  es va utilitzar el *MyoPacer Field Stimulator* (IONOPTIX, Westwood, MA, EUA), el qual permet estimular les cèl·lules amb ones quadrades a la freqüència, duració i amplitud desitjades. En els experiments es van enregistrar les imatges a una freqüència de 32 Hz durant els últims 20 s de l'estimulació elèctrica de 40 s amb un pols quadrat de 25 V, 5 ms a 0.5 Hz. Pels registres en condicions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, es va aplicar NK suplementat amb ISO 100 nM amb la pipeta local *MPRE8* (Cell Microcontrols) 2 min abans de començar el registre.

Dels transitoris registrats es va mesurar l'amplitud del transitori, el temps d'alliberació entre 10-90%, el temps de recaptació entre 50-10% i 90-10%, i la durada al 50% del

## Material i mètodes

transitori (Figura 18). Per a cada una de les cèl·lules es va fer la mitjana dels paràmetres analitzats dels 3 primers transitoris del registre.

### 4. Seqüenciació del genoma dels individus

La seqüenciació i l'anàlisi bioinformàtic del genoma dels cinc individus portadors de la mutació RYR2\_c.G1069A es va fer al Centre Nacional d'Anàlisi Genòmica (CNAG-CRG). A continuació s'expliquen breument els mètodes utilitzats.

Les llibreries de *short-insert paired-end* es van preparar amb un protocol sense PCR utilitzant el Kit *KAPA Library Preparation* (KK8200, Roche) seguint les indicacions del fabricant. Breument, 2 µg de DNA genòmic van ser fragmentats amb l'ultrasonicador *Covaris E210* (Covaris, Woburn, MA, EUA) per a l'obtenció de fragments d'aproximadament 500 bp. Els fragments de DNA es van seleccionar per mida i es van purificar amb *AMPure XP beads* (A63881, Beckman Coulter, Brea, CA, EUA). Es van reparar els extrems, es van adenilar i es van lligar els adaptadors *paired-end* específics d'Illumina (Integrated DNA Technologies). Les llibreries obtingudes es van quantificar amb *Library Quantification Kit* (KK4824, Roche) abans de la seva seqüenciació.

La seqüenciació es va fer en un *HiSeq4000* (Illumina, San Diego, CA, EUA) amb el mètode *paired-end* amb lectures de llargada de 2X151+8+8bp amb el *HiSeq4000 PE Cluster Kit* (PE-410-1001, Illumina) seguint les indicacions del fabricant. L'anàlisi d'imatges, el *base calling* i l'anàlisi de qualitat de la seqüenciació es va fer amb el software *Real Time Analysis* (RTA 2.7.7), i seguidament es van generar els arxius FASTQ pel seu posterior anàlisi bioinformàtic.

Els fragments llegits van ser mapejats al genoma humà de referència hg19 (hs37d5) utilitzant l'algoritme *Burrows-Wheeler Alignment- Maximal Exact Match* (BWA-MEM).<sup>183</sup> Els fitxers de l'alineament que contenien només els fragments llegits de mapatge únic i sense duplicats es varen processar utilitzant *picard tools version 1.110*.<sup>184</sup> Amb la versió 3.6 de *Genome Analysis Tool Kit* (GATK)<sup>185</sup> es va fer un realineament local i la calibració de la qualitat de cada una de les bases llegides. Els arxius amb els alineaments processats es van carregar al *GATK HaplotypeCaller* per a la identificació de variants d'un sol nucleòtid (SNV), insercions i delecions (INDELS). L'anotació funcional

## Material i mètodes

de les diferents variants es va afegir utilitzant el *SNP Effect* (snpEff)<sup>186</sup> amb la base de dades GRCh37 (hs37d5).

Utilitzant el programari *SNP Sorting Intolerant From tolerant* (snpSift) es van anotar les variants a partir de les dades de *Human dbSNP* versió 137 i del *Exome Variant Server*, així com amb la informació sobre freqüències poblacionals de 1000 Genomes. Les prediccions sobre conservació i patogenicitat de les variants es van obtenir a partir de les dades del *database for nonsynonymous SNP's functional predictions* (dbNSFP), utilitzant també el programari snpSift.<sup>187</sup>

Un cop obtinguda la classificació de l'efecte tant dels SNV com dels INDELS, vam focalitzar la següent part de l'anàlisi en 140 gens associats a diferents malalties arritmogèniques: *ABCC9, ACTC1, ACTN2, AKAP9, ANK2, ANKRD1, ATP2A2, BAG3, CACNA1C, CACNA2D1, CACNA1G, CACNA1H, CACNA1I, CACNB2, CALM1, CALM2, CALM3, CALR3, CASQ2, CAV3, CRYAB, CSRP3, CTNNA3, GJA1, CTF1, DES, DMD, DMPK, DPP6, DSC2, DSG2, DSP, DTNA, ECE1, EMD, EN1, EYA4, FHL2, FGF12, FKTN, FLNA, FLNC, GAA, GJA5, GLA, GPD1L, HAX1, HCN1, HCN2, HCN4, HEY2, HRC, HSPB6, JPH2, JUP, KCNA5, KCND2, KCND3, KCNE1, KCNE2, KCNE3, KCNE4, KCNE5, KCNH2, KCNJ2, KCNJ5, KCNJ8, KCNQ1, LAMA4, LAMP2, LDB3, LMNA, LRRC10, MYBPC3, MYH6, MYH7, MYL2, MYL3, MYLK2, MYOZ2, MYPN, NEBL, NEXN, NOS1AP, NOTCH1, NPPA, NUP155, PDLIM3, PHOX2A, PHOX2B, PITX2, PKP2, PLN, PPP1R1A, PPP1R3A, PRKACA, PRKAG2, RANGRF, RAPGEF3, RBM20, RYR2, SCN1B, SCN2B, SCN3B, SCN4B, SCN1A, SCN2A, SCN3A, SCN4A, SCN5A, SCN8A, SCN9A, SCN10A, SCN11A, SDHA, SEMA3A, SGCD, SLC22A5, SLC6A4, SLC8A1, SLMAP, SLN, SNTA1, TAZ, TCAP, TECRL, TGFB3, TLX3, TMEM43, TMPO, TNNC1, TNNI3, TNNT2, TP63, TPM1, TRDN, TRIM63, TRPM4, TTN, TTR, VCL, XIRP1, XIRP2.*

Per a la classificació de les variants genètiques identificades en els 140 gens d'interès, es van seguir els criteris de les guies de *Association for Molecular Genetics and Genomics/Association for Molecular Pathology* (ACMG/AMP).<sup>188-192</sup> Aquests permeten determinar la implicació de les variants en la malaltia. Els criteris utilitzats per a la classificació de les variants són: (1) Criteris sobre dades poblacional, (2) Criteris sobre dades computacionals i predictives, (3) Criteris funcionals, (4) Criteris de segregació, (5) Criteris *de novo*, (6) Criteris sobre dades al·lèliques i (7) altres dades. A la Taula 29 es

## Material i mètodes

mostra l'organització dels criteris per a la classificació de les variants en benignes o patogènics. Cadascun dels criteris patogènics està ponderat com a *very strong*, *strong*, *moderate* i *supporting* indicant-ne la força. En canvi, els criteris benignes, estan ponderats com a *stand alone* (indicant que es poden utilitzar de manera autònoma), *strong* o *supporting*. Alhora, cada criteri té un codi assignat que indica la classificació (patogènica o benigna) i el nivell de força. Els criteris són seleccionats segons les evidències disponibles sobre la variant que s'està classificant. Aquests es combinen seguint unes normes de puntuació en un sistema de 5 nivells per tal d'obtenir la classificació de la variant en les següents categories: Patogèniques (P), Possiblement patogèniques (PP), Possiblement Benignes (PB) o Benignes (B). Tot i així, aquelles variants que compleixen criteris contradictoris per condicions benignes i patogèniques, no poden ser classificades en cap de les quatre categories anteriors i es classificaran com a variants de significat incert (VSI). La descripció de cada un dels criteris i les seves combinacions per a la classificació de les variants es troba a l'Annex 1.

**Taula 29. Organització dels criteris de les guies ACMG/AMP per a la classificació de variants genètiques. "Sp" Supporting, "Md" Moderate, "St" Strong, "VS" Very Strong.**

	Criteris Benignes		Criteris Patogènics			
	<i>Strong</i>	<i>Supporting</i>	<i>Supporting</i>	<i>Moderate</i>	<i>Strong</i>	<i>Very Strong</i>
<b>Dades Poblacionals</b>	BA1, BS1		PM2_Sp, PS4_Sp	PS4_Md	PS4_St	
<b>Dades Computacionals i predictives</b>		BP4, BP1, BP7, BP3	PP3, PM4_Sp, PM5_Sp, PS1_Sp, PVS1_Sp	PM4, PM5, PS1_Md, PVS1_Md	PM5_St, PS1, PVS1_St	PVS1_VS
<b>Dades Funcionals</b>	BS3		PP2	PM1	PS3	
<b>Dades de Segregació</b>	BS4		PS4_Sp	PS4_Md	PS4_St	
<b>De Novo</b>			PS2_Sp	PS2_Md	PS2_St	PS2_VS
<b>Dades al·lèliques</b>		BP2	PM3_Sp	PM3	PM3_St	PM3_VS
<b>Altres Dades</b>		BP5	PP4			

### 5. Anàlisi estadística

L'anàlisi estadística de les dades de citometria i qPCR es va fer amb el *Kruskal-Wallis* ANOVA, donat que el nombre de mostres era baix, amb el test *post-hoc* de Dunn.

Pels experiments de western blot i els experiments de transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per estimulació elèctrica de camp i per cafeïna 10 mM, primer es va analitzar la normalitat

## Material i mètodes

de les dades amb el test de Shapiro-Wilk. Si les dades tenien distribució normal (test de Shapiro-Wilk  $p$ -valors  $>0.05$ ) es va realitzar una *One-way* ANOVA amb el test *post-hoc* de Bonferroni. Però si les dades no es distribuïen de forma normal (test de Shapiro-Wilk  $p$ -valors  $<0.05$ ), es va realitzar la *Kruskal-Wallis* ANOVA amb el test *post-hoc* de Dunn. Tots aquests anàlisis es van realitzar amb el programa Origin Pro 2022b (OriginLab, Northampton, MA, EUA).

Per la comparació dels valors en condicions basals i ISO 100 nM, dels registres de transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica i per cafeïna 10 mM, primer es va fer un test per determinar la similitud de variàncies entre les dues mostres seguit del test-T per comparar les mitjanes entre les dues condicions per cada una de les línies.

L'anàlisi estadística de les corbes concentració-resposta de cafeïna es va fer comparant l'ajust dels paràmetres de la corba de Hill entre parelles de condicions amb el programa Origin Pro 2022b.

## **VI. RESULTATS**



## Resultats

### 1. Caracterització de les línies iPSC generades

Per tal de caracteritzar les línies iPSC, es va seleccionar un clon de cada una de les cinc línies iPSC generades dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S i un clon de la línia iPSC de l'individu control sa GPG1, que ja havia estat prèviament generada al laboratori. Tots els tests descrits a l'apartat 2.2 de material i mètodes es van dur a terme per assegurar que les línies iPSC generades es trobaven en un estat pluripotent endogen i tenien la capacitat de diferenciar-se. Els resultats de la caracterització es troben resumits a la Taula 30.

**Taula 30. Taula resum de la caracterització de les línies iPSC.**

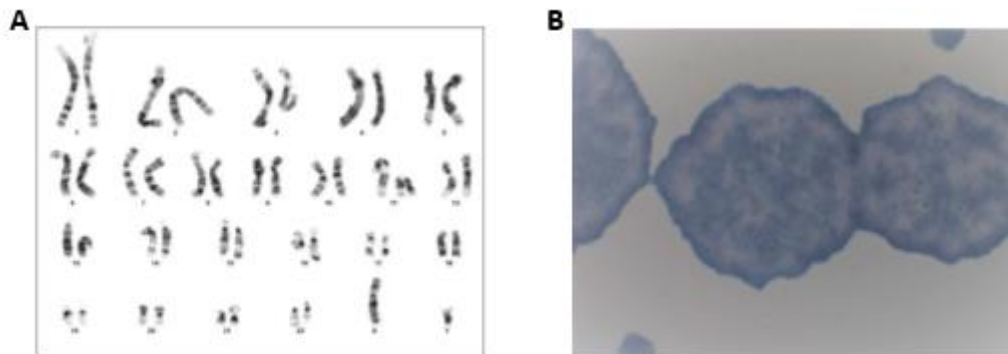
	GPG1	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-55
Test de Micoplasma	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
Presència de vectors de reprogramació	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu	Negatiu
Fosfatasa alcalina	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu	Positiu
Cariotip	46, XY	46, XY	46, XX	46, XY	46, XY	46, XX
Test de pluripotència	Positiu per: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81	Positiu per: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81	POSITIU PER: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81	Positiu per: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81	Positiu per: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81	Positiu per: OCT-4, SSEA-3, SSEA-4, NANOG, SOX-2, TRA-1-60, TRA-1-81
Diferenciació <i>in vitro</i>	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP	Ectoderm positiu: Tuj1, GFAP
	Endoderm positiu: AFP, FOXA2	Endoderm positiu: AFP, FOXA2	Endoderm positiu: AFP, FOXA2	Endoderm positiu: AFP, FOXA2	Endoderm positiu: AFP, FOXA2	Endoderm positiu: AFP, FOXA2
	Mesoderm positiu: ASMA, ASA	Mesoderm positiu: ASMA, ASA	Mesoderm positiu: ASMA, ASA	Mesoderm positiu: ASMA, ASA	Mesoderm positiu: ASMA, ASA	Mesoderm positiu: ASMA, ASA

Els resultats de la caracterització (Taula 30) van mostrar l'absència de micoplasma i de vectors de reprogramació. Al cariotip de totes les línies no es va observar cap anomalia estructural. També, totes les línies van mostrar tinció de fosfatasa alcalina, enzim molt sobreexpressat a les iPSC. A la Figura 19 es mostren un cariotip (Figura 19A) i una tinció



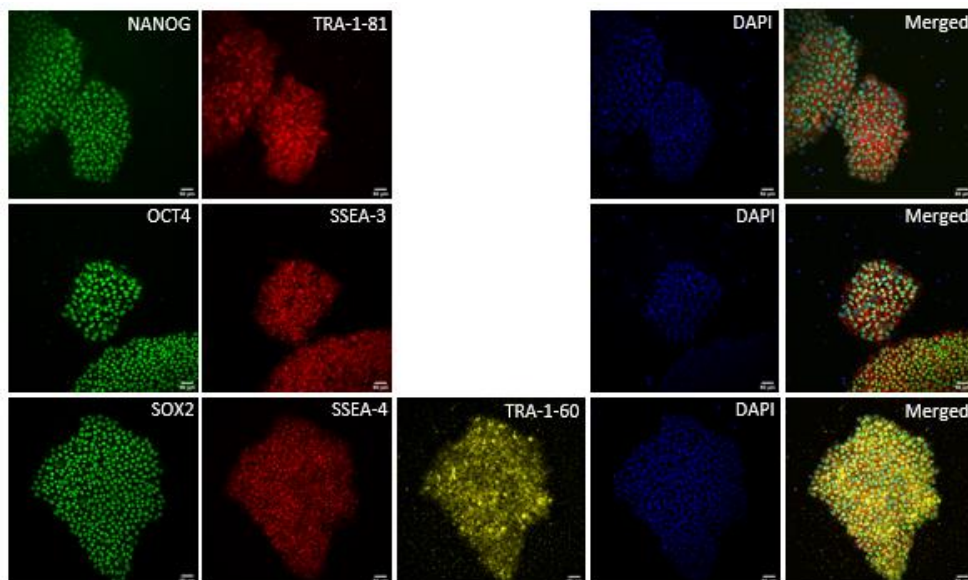
## Resultats

de fosfatasa alcalina (Figura 19B) representatives. El cariotip i les tincions de fosfatasa alcalina de la resta de línies iPSC es troben a l'annex 1 (Fig.S1-S5).



**Figura 19. Cariotip (A) i tinció de la fosfatasa alcalina (B) de la línia iPSC de l'individu CPVT-51.**

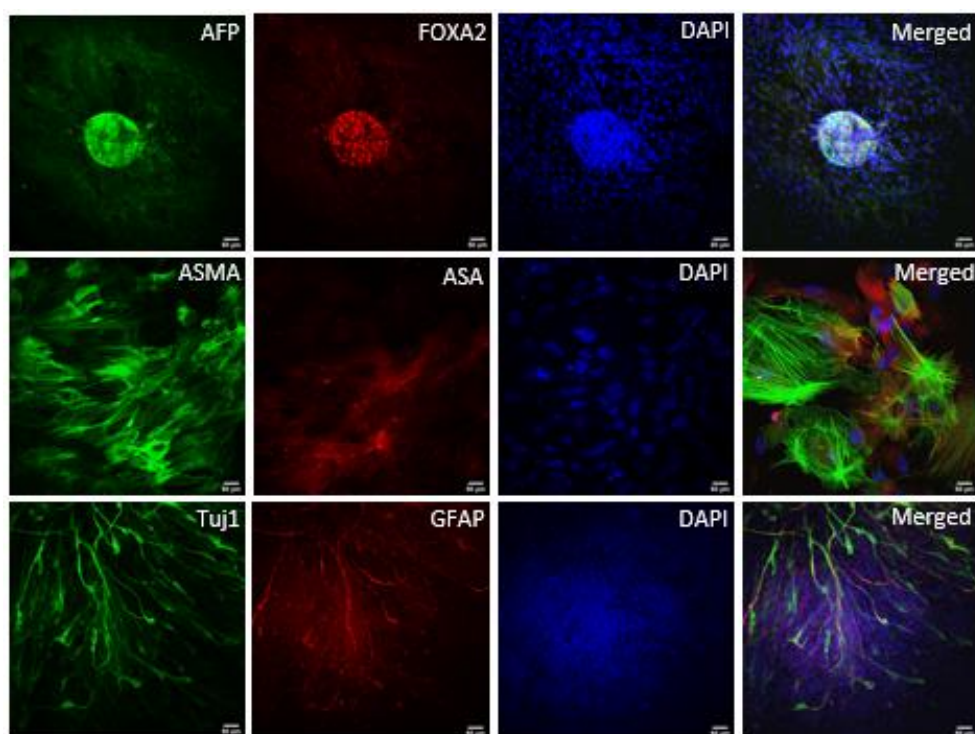
Tots els clons seleccionats de les línies iPSC de tots els individus van mostrar marcatge positiu pels factors de transcripció de pluripotència NANOG, TRA-1-81, OCT-4, SSEA-3, SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 per immunofluorescència. A la Figura 20 es mostra com a exemple el marcatge positiu per immunofluorescència dels set factors de transcripció associats a pluripotència per a una de les línies. Les immunofluorescències de les altres línies iPSC es troben a l'annex 1 (Fig. S6-S10).



**Figura 20. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-51. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 μm.**

## Resultats

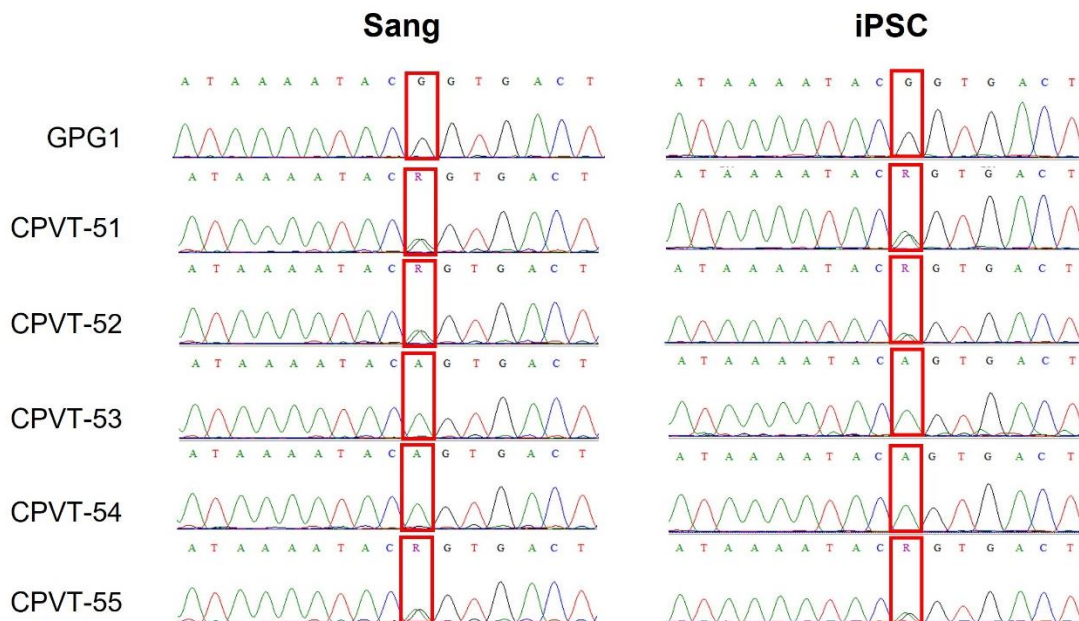
A més de demostrar l'expressió dels factors de transcripció de pluripotència, es va testar *in vitro* la capacitat de les línies iPSC de diferenciar-se a diferents tipus cel·lulars de les tres capes germinals. Es va fer el marcatge immunohistoquímic contra marcadors endodèmics (AFP i FOXA2), mesodèmics (ASMA i ASA) i ectodèmics (Tuj1 i GFAP). Es va observar marcatge positiu per a tots els marcadors de les tres capes germinals a totes les línies iPSC. A la Figura 21 es mostren les immunohistoquímiques d'una de les línies iPSC. A l'annex 1 (Fig. S11-S15) es troben les immunohistoquímiques de les altres línies iPSC.



**Figura 21. Immunohistoquímica de la diferenciació *In vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-51.** La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la línia iPSC de l'individu CPVT-51 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), a mesoderm (part mitja) i a ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

### 1.1. Determinació de la presència de la mutació *RYR2\_c.G1069A* a les línies iPSC

Per determinar si la mutació *RYR2\_c.G1069A* s'havia mantingut durant el procés de reprogramació dels fibroblasts a iPSC, vam extreure DNA genòmic de les diferents línies iPSC. Mitjançant PCR i seqüenciació per Sanger es va analitzar la presència de la mutació a les cinc línies iPSC dels individus portadors de la mutació, i es va avaluar l'absència de la mutació a la línia de l'individu control sa (Figura 22).



**Figura 22.** Seqüenciació de l'exó 13 de *RYR2* a les mostres de sang (esquerra) i les sis línies iPSC (dreta) dels individus portadors de la mutació *RYR2\_c.G1069A* i de l'individu control sa. Es pot observar l'absència de mutació en la regió analitzada tant en sang com a les iPSC de l'individu control sa GPG1 (fila superior). Es va observar la presència de la mutació en heterozigosi (R) a les mostres de sang i iPSC dels individus CPVT-51 (segona fila), CPVT-52 (tercera fila) i CPVT-55 (sisena fila). A les mostres de sang i a les línies iPSC dels individus CPVT-53 (quarta fila) i CPVT-54 (cinquena fila) es va poder observar la presència de la mutació en homozigosi.

Es va poder determinar que durant el procés de reprogramació la mutació *RYR2\_c.G1069A* s'havia mantingut en heterozigosi a les línies iPSC dels individus CPVT-51, CPVT-52 i CPVT-55, i en homozigosi a les línies dels individus CPVT-53 i CPVT-54. A la línia iPSC de l'individu control no es va observar la presència de la mutació *RYR2\_c.G1069A*.

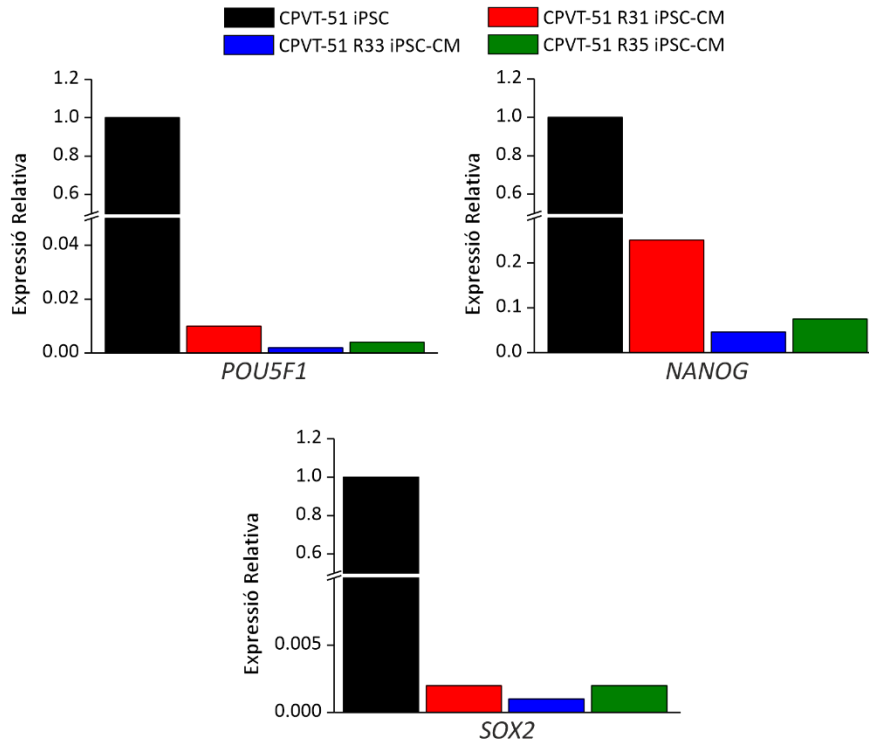
## 2. Caracterització dels iPSC-CM mitjançant marcadors de pluripotència i cardíacs

### 2.1. El protocol de diferenciació reprimeix l'expressió de factors de transcripció de pluripotència i indueix l'expressió dels gens codificants per proteïnes citoesquelètiques cardíques

Per avaluar si el protocol de diferenciació induïa la diferenciació de les iPSC a iPSC-CM vam voler determinar si es donava la repressió de l'expressió dels gens codificants pels factors de transcripció de pluripotència NANOG (gen *NANOG*), SOX2 (gen *SOX2*) i OCT4 (gen *POU5F1*) per qPCR. Els resultats van mostrar com als iPSC-CM s'havia produït el

## Resultats

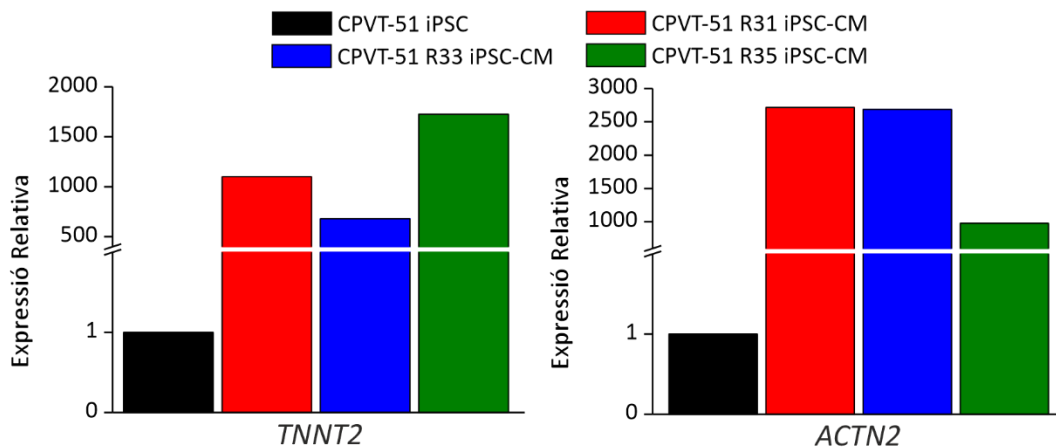
silenciament de l'expressió dels factors de transcripció de pluripotència comparat amb les seves respectives iPSC. A la Figura 23 es mostren els nivells d'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* dels iPSC-CM de l'individu CPVT-51. Els nivells d'expressió relatius de les altres línies es troben a l'annex 1 (Fig.S16-S20).



**Figura 23.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren una repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatius de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

Seguidament, vam analitzar si el protocol de diferenciació induïa l'augment dels nivells d'expressió dels gens codificants per les proteïnes citoesquelètiques cardíques troponina T (gen *TNNT2*) i  $\alpha$ -actinina (gen *ACTN2*). Els resultats van mostrar la sobreexpressió de *TNNT2* i *ACTN2* en totes les mostres d'iPSC-CM comparat amb les seves respectives iPSC. A la Figura 24 es mostren els nivells d'expressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* dels iPSC-CM de la línia CPVT-51. Els nivells d'expressió relatius de les altres línies es troben a l'annex 1 (Fig.S21-25).

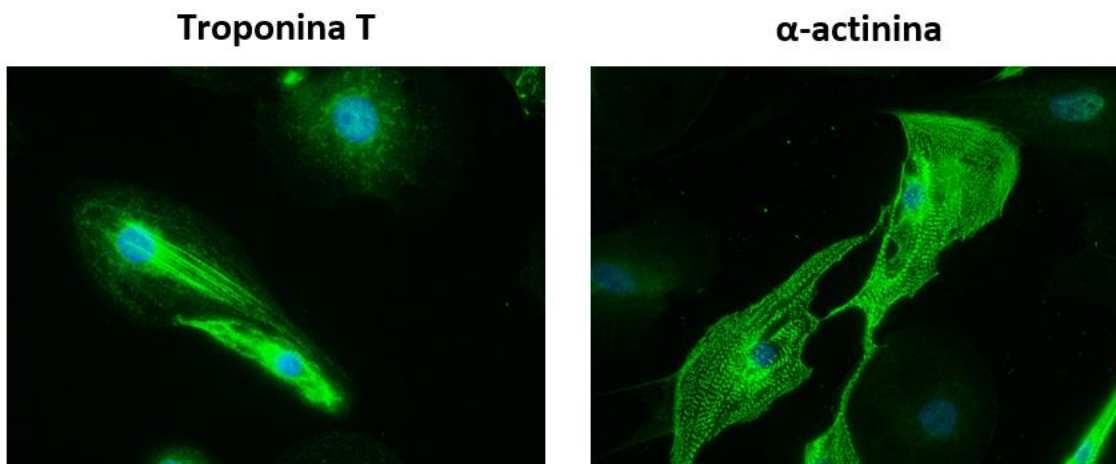
## Resultats



**Figura 24.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.

### 2.2. Els iPSC-CM presenten marcatge organitzat de troponina T i $\alpha$ -actinina per immunofluorescència

Determinat l'augment d'expressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* en els iPSC-CM, es va voler avaluar si es podia observar la presència de marcatge organitzat representatiu de proteïnes citoesquelètiques com la troponina T i  $\alpha$ -actinina en els iPSC-CM. Les immunofluorescències dels iPSC-CM tant dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S com de l'individu control sa, van mostrar tinció positiva amb un patró organitzat típic de proteïnes citoesquelètiques per ambdues proteïnes. A la Figura 25 es poden observar les imatges representatives de les tincions per immunofluorescència per troponina T i  $\alpha$ -actinina dels iPSC-CM de l'individu CPVT-52. A l'annex 1 (Figura S26-S30) es troben les immunofluorescències dels iPSC-CM dels altres individus.

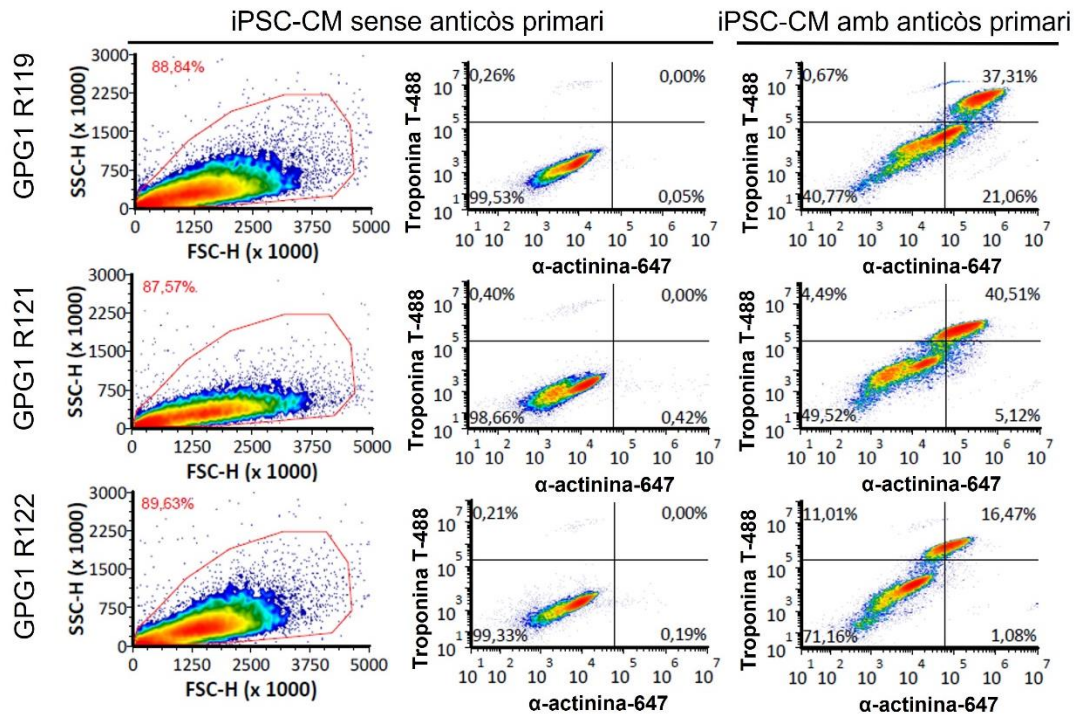


**Figura 25.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).

### 2.3. Eficiència de diferenciació a iPSC-CM

Mitjançant citometria de flux es va voler determinar l'eficiència de diferenciació a iPSC-CM de les línies cel·lulars iPSC. Per aquest assaig es van seleccionar les línies iPSC de l'individu control sa, de l'individu heterozigot per la mutació CPVT-52 i de l'individu homozigot per la mutació CPVT-53. Per a cada una de les línies, es va analitzar la puresa d'iPSC-CM, de 2-3 diferenciacions independents a dia 15-16 postinici de diferenciació, utilitzant com a marcadors troponina T i  $\alpha$ -actinina. A la Figura 26 es mostra un exemple representatiu dels resultats de la citometria de tres diferenciacions independents de l'individu control sa GPG1. La resta de resultats de citometria es troben a l'annex 1 a les Figures S31-33.

## Resultats

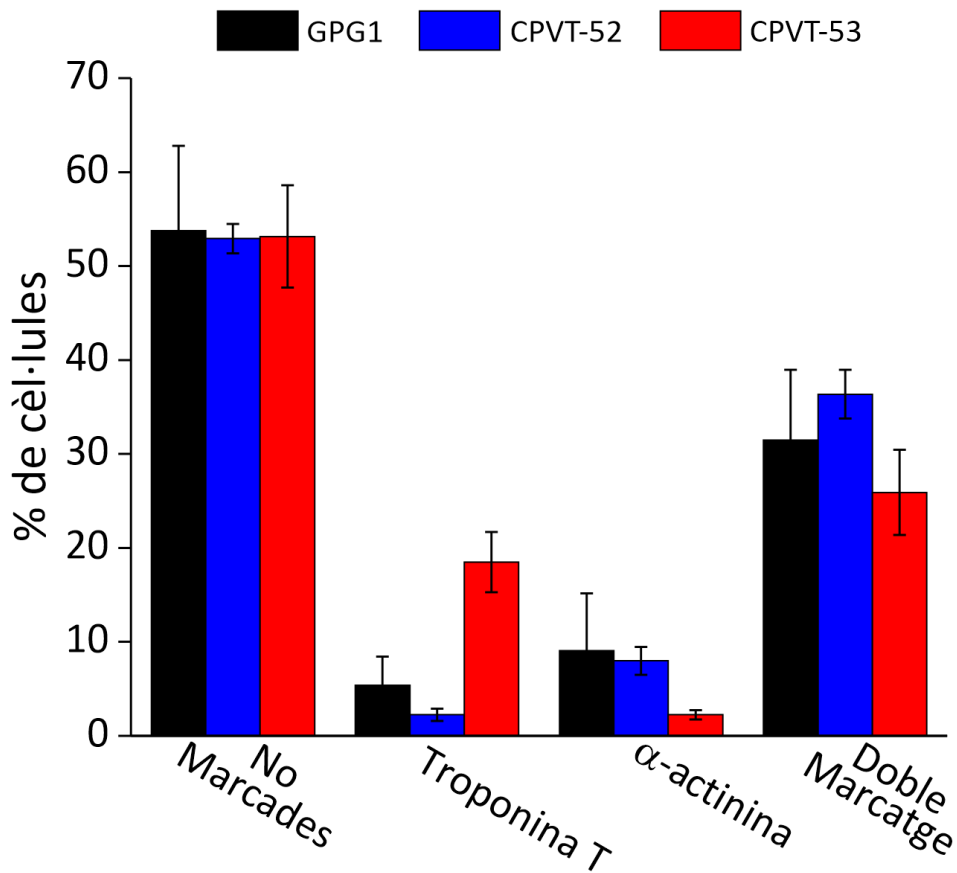


**Figura 26.** Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC de l'individu control sa GPG1 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules. "488" indica que s'ha marcat l'anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 488 per a la seva detecció i "647" indica que s'ha marcat l'anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 647 per a la seva detecció. Es mostra la composició de la població analitzada segons mida (FSC-H) i complexitat citoplasmàtica (SSC-H) (esquerra), la mesura de la fluorescència de la població control únicament amb anticòs secundari (centre) i el marcatge de cèl·lules per troponina T i  $\alpha$ -actinina (dreta). Els quadrants dels gràfics de fluorescència (dreta) representen no marcatge (quadrant inferior esquerra), marcatge únic per  $\alpha$ -actinina (quadrant inferior dret), marcatge només per troponina T (quadrant superior esquerra) i doble marcatge (quadrant superior dret).

Aproximadament, un 50% de les cèl·lules analitzades per a cada una de les línies iPSC dels tres individus no van presentar cap tipus de marcatge (GPG1=53.78 $\pm$ 9%, CPVT-52=52.92 $\pm$ 1.57% i CPVT-53=53.14 $\pm$ 5.48%). La resta de cèl·lules mostraven marcatge cardíac en diferents proporcions, com cèl·lules que únicament expressaven troponina T (GPG1=5.4 $\pm$ 3.03%, CPVT-52=2.24 $\pm$ 0.65% i CPVT-53=18.49 $\pm$ 3.21%), cèl·lules que només expressaven  $\alpha$ -actinina (GPG1=9.08 $\pm$ 6.10%, CPVT-52=7.99 $\pm$ 1.49% i CPVT-53=2.24 $\pm$ 0.50%) i cèl·lules que expressaven tant troponina T com  $\alpha$ -actinina (GPG1=31.46 $\pm$ 7.50%, CPVT-52=36.35.81 $\pm$ 2.59% i CPVT-53=25.91 $\pm$ 4.52%). L'anàlisi no

## Resultats

va mostrar diferències en la contribució de les quatre poblacions detectades en les diferenciacions independents de les línies iPSC a iPSC-CM dels tres individus (Figura 27).



**Figura 27.** L'eficiència de diferenciació és igual per les línies iPSC dels tres individus. Es mostra la mitjana±ES dels percentatges de cada una de les poblacions de cèl·lules per a cada una de les diferenciacions independents (GPG1 n=3, CPVT-52 n=2, CPVT-53 n=3). \*p-valor< 0.05, Kruskal-Wallis ANOVA.

Es va considerar que les cèl·lules no marcades corresponien a iPSC que no s'havien diferenciat a iPSC-CM. Les cèl·lules que van mostrar únicament expressió de troponina T o α-actinina correspondrien a iPSC no diferenciades completament o correctament a iPSC-CM. Finalment, les cèl·lules positives tant per troponina T com per α-actinina es van considerar com les iPSC correctament diferenciades a iPSC-CM. Els nivells d'iPSC-CM diferenciats no diferia entre línies, mostrant homogeneïtat en la diferenciació a iPSC-CM. Per tant, vam poder afirmar que la diferenciació mitjana de les nostres línies iPSC a iPSC-CM era d'almenys un 30.60±3.30%.



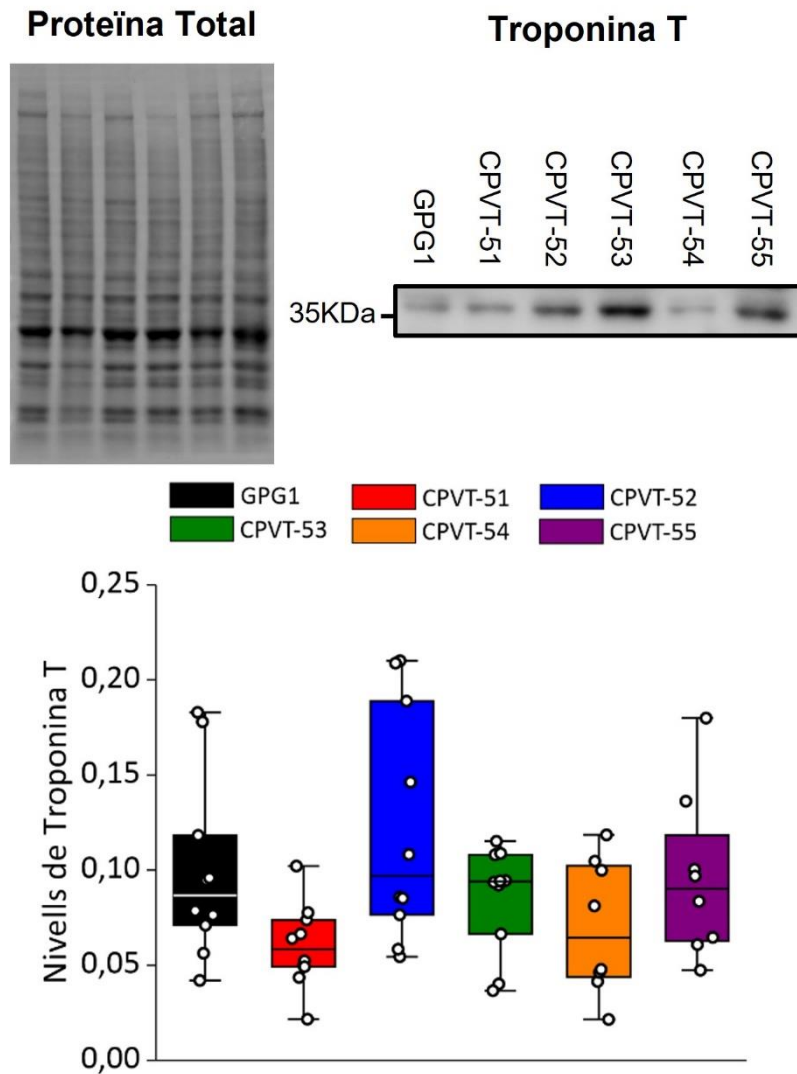
## Resultats

### **2.4. Els nivells de troponina T i $\alpha$ -actinina no difereixen entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S i els iPSC-CM de l'individu control sa**

Els experiments de citometria de flux van mostrar la presència de 4 subpoblacions de cèl·lules dins de cada una de les diferenciacions independents. Tot i que la composició de subpoblacions no diferia entre individus, vam voler determinar si aquestes afectaven als nivells totals de troponina T i  $\alpha$ -actinina. Per aquest motiu, vam realitzar experiments de western blot amb 8-10 diferenciacions independents d'iPSC a iPSC-CM pels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S i per l'individu control sa.

Els experiments de western blot van mostrar que no hi havia diferències en els nivells de troponina T entre els iPSC-CM de l'individu control sa i els portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, ni entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació en homozigosi i heterozigosi (Figura 28).

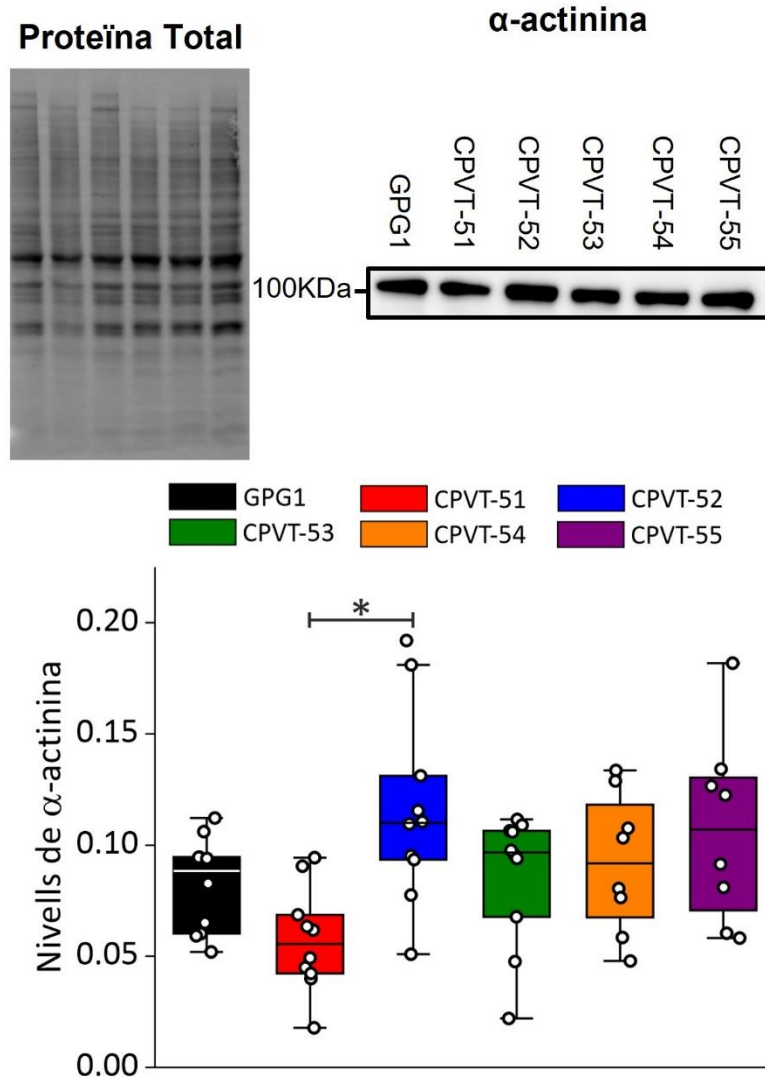
## Resultats



**Figura 28.** Els iPSC-CM de l'individu control sa i dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S presenten nivells semblants de troponina T. A la part superior es mostra la proteïna total de les mostres (esquerra) i la detecció per western blot de troponina T (dreta). A la part inferior es mostra la sobreposició d'un *dot plot* que mostra el nivell de troponina T de cada una de les mostres, i un gràfic de caixes que mostra la distribució dels nivells de troponina T de les diferenciacions independents a iPSC-CM dels diferents individus (GPG1 n=10, CPVT-51 n=10, CPVT-52 n=10, CPVT-53 n=10, CPVT-54 n=8 i CPVT-55 n=8). Significança analitzada amb Kruskal-Wallis ANOVA.

En el cas dels nivells de  $\alpha$ -actinina, no es van observar diferències entre els iPSC-CM de l'individu control sa i els portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, però sí que es va observar com els iPSC-CM de l'individu heterozigot CPVT-52 mostraven una major quantitat de  $\alpha$ -actinina respecte als iPSC-CM de l'individu CPVT-51 (Figura 29).

## Resultats



**Figura 29.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 presenta nivells superiors de  $\alpha$ -actinina respecte l'individu CPVT-51. A la part superior es mostra la proteïna total de les mostres (esquerra) i la detecció per western blot de  $\alpha$ -actinina (dreta). A la part inferior es mostra la sobreposició d'un *dot plot* que mostra el nivell de  $\alpha$ -actinina de cada una de les mostres i un gràfic de caixes que mostra la distribució dels nivells de  $\alpha$ -actinina de les diferenciacions independents a iPSC-CM dels diferents individus (GPG1 n=10, CPVT-51 n=10, CPVT-52 n=10, CPVT-53 n=10, CPVT-54 n=8 i CPVT-55 n=8). \*p-valor< 0.05, Kruskal-Wallis ANOVA.

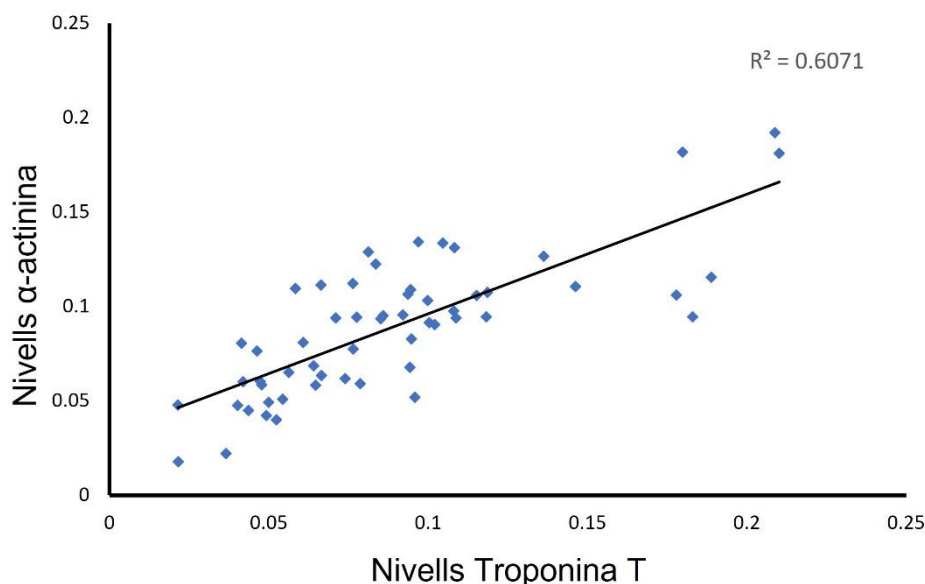
### 2.5. Els nivells de troponina T i $\alpha$ -actinina poden ser utilitzats com a normalitzadors de l'eficiència de diferenciació de les iPSC a iPSC-CM

Els experiments anteriors van mostrar com la presència de diferents subpoblacions dins de cada una de les diferenciacions no afectava als nivells de troponina T, però si que podria introduir diferències en els nivells de  $\alpha$ -actinina. La dispersió observada en els nivells d'expressió d'ambdues proteïnes mostrava la necessitat de determinar si els

## Resultats

nivells de troponina T i  $\alpha$ -actinina podien ser usats com a normalitzadors per determinar la quantitat de cèl·lules iPSC diferenciades a iPSC-CM dins les nostres diferenciacions.

Per aquest propòsit vam utilitzar els nivells de troponina T i  $\alpha$ -actinina dels experiments de western blot de les mostres d'iPSC-CM de tots els individus per fer una correlació entre els nivells d'ambdues proteïnes (Figura 30). La correlació va mostrar que el coeficient de determinació ( $R^2$ ) era de 0.6071, el qual ens va indicar que el nivell de correlació era alt entre les dues proteïnes. Aquest fet ens va indicar que els nivells de troponina T i de  $\alpha$ -actinina podien ser utilitzats com a normalitzadors de l'eficiència de diferenciació a iPSC-CM pels anàlisis moleculars de nivells d'expressió per RNA i proteïna.



**Figura 30.** Els nivells de troponina T i de  $\alpha$ -actinina presenten una alta correlació. Es mostra la dispersió dels valor d'expressió a nivell de proteïna de troponina T i  $\alpha$ -actinina per a cada una de les diferenciacions independents (rombes blaus), la recta de regressió (línia negra) i el seu coeficient de determinació ( $R^2$ ).

### 3. El tractament amb T3+Dex indueix un augment de l'inotropisme en resposta a l'estimulació $\beta$ -adrenèrgica

El protocol de diferenciació utilitzat al laboratori fins al moment de l'inici d'aquesta tesi no comprenia cap fase d'inducció de maduració dels iPSC-CM. Tal com s'ha explicat anteriorment a l'apartat 5.3 de la introducció, les evidències presents en la literatura mostren que els iPSC-CM són a nivell fenotípic immadurs. L'efecte de la immaduresa en

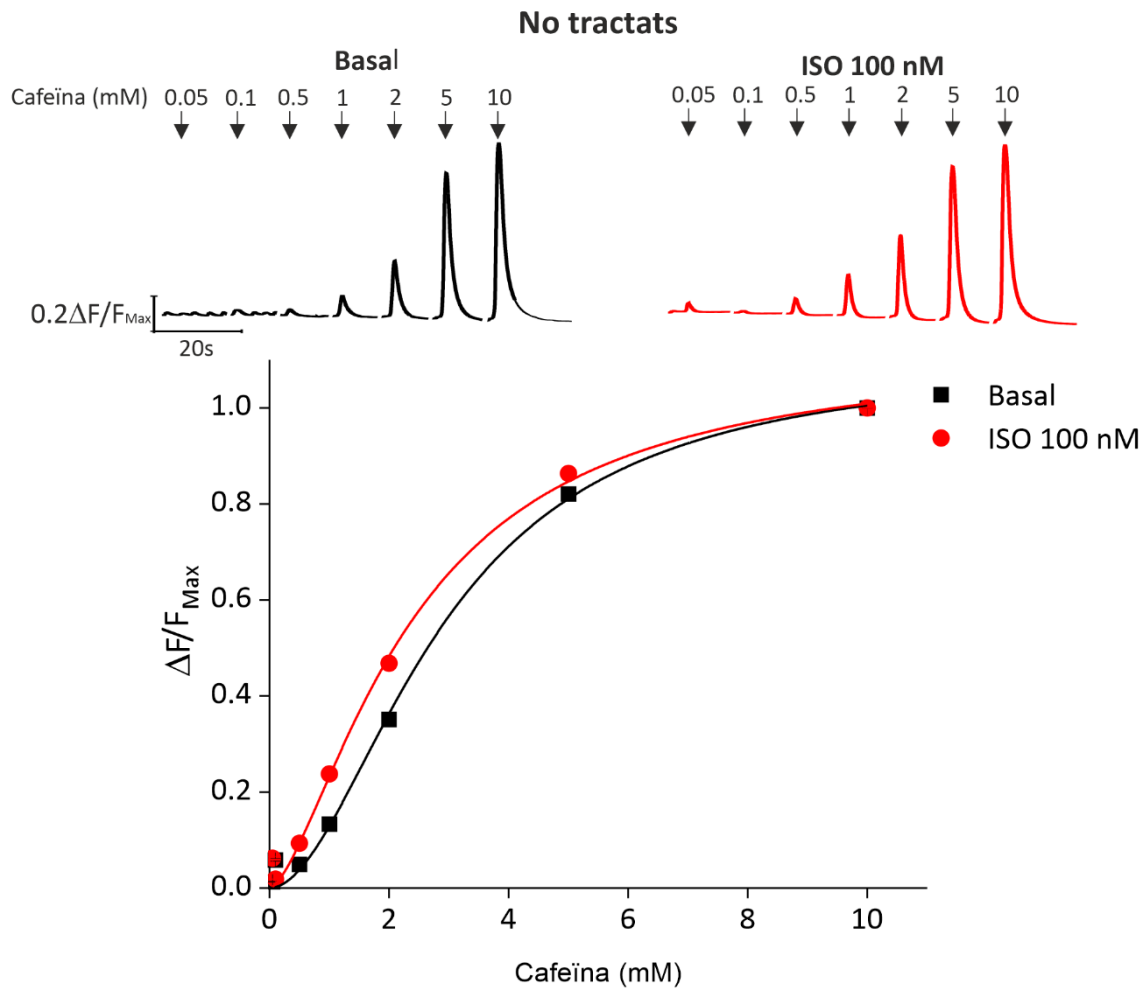
## Resultats

les propietats electrofisiològiques dels iPSC-CM dificulta el seu ús pel modelatge de malalties arritmogèniques. En el cas de la CPVT, les arrítmies malignes es desencadenen en situacions d'estrès emocional o físic degut a l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica. La resposta als estímuls  $\beta$ -adrenèrgics es troba estretament lligada a la maduresa dels cardiomiòcits. Els cardiomiòcits immadurs no presenten una resposta completa a aquests estímuls sinó que, en presència d'agonistes  $\beta$ -adrenèrgics, només veuen modificats el lusitropisme i cronotropisme sense efecte sobre l'inotropisme. En canvi, en estats més madurs l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica també modifica l'inotropisme.<sup>27-29</sup>

Per determinar si el tractament amb T3+Dex induïa la maduració dels iPSC-CM, vam realitzar corbes concentració-resposta de cafeïna amb iPSC-CM de l'individu control sa per determinar si podíem detectar un augment de l'inotropisme en estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. Per aquest propòsit, vam utilitzar iPSC-CM de l'individu control sa no tractats i tractats amb T3+Dex per mesurar la quantitat relativa de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberada a cada una de les concentracions de cafeïna aplicades. Els experiments es van realitzar en condicions basals i en presència de l'agonista  $\beta$ -adrenèrgic ISO 100 nM.

La comparació dels ajustaments de Hill de les corbes concentració-resposta en els iPSC-CM no tractats en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM van mostrar que l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica induïa un augment de la resposta dels RYR2 a dosis submàximes de cafeïna (inferiors a 10 mM) en presència d'ISO 100 nM. Aquest augment va resultar estadísticament significatiu. Indicant que en presència d'ISO 100 nM es produïa un augment de l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$ , i per tant un augment en l'inotropisme, en concentracions de cafeïna submàximes respecte a les condicions basals (Figura 31 i Taula 31).

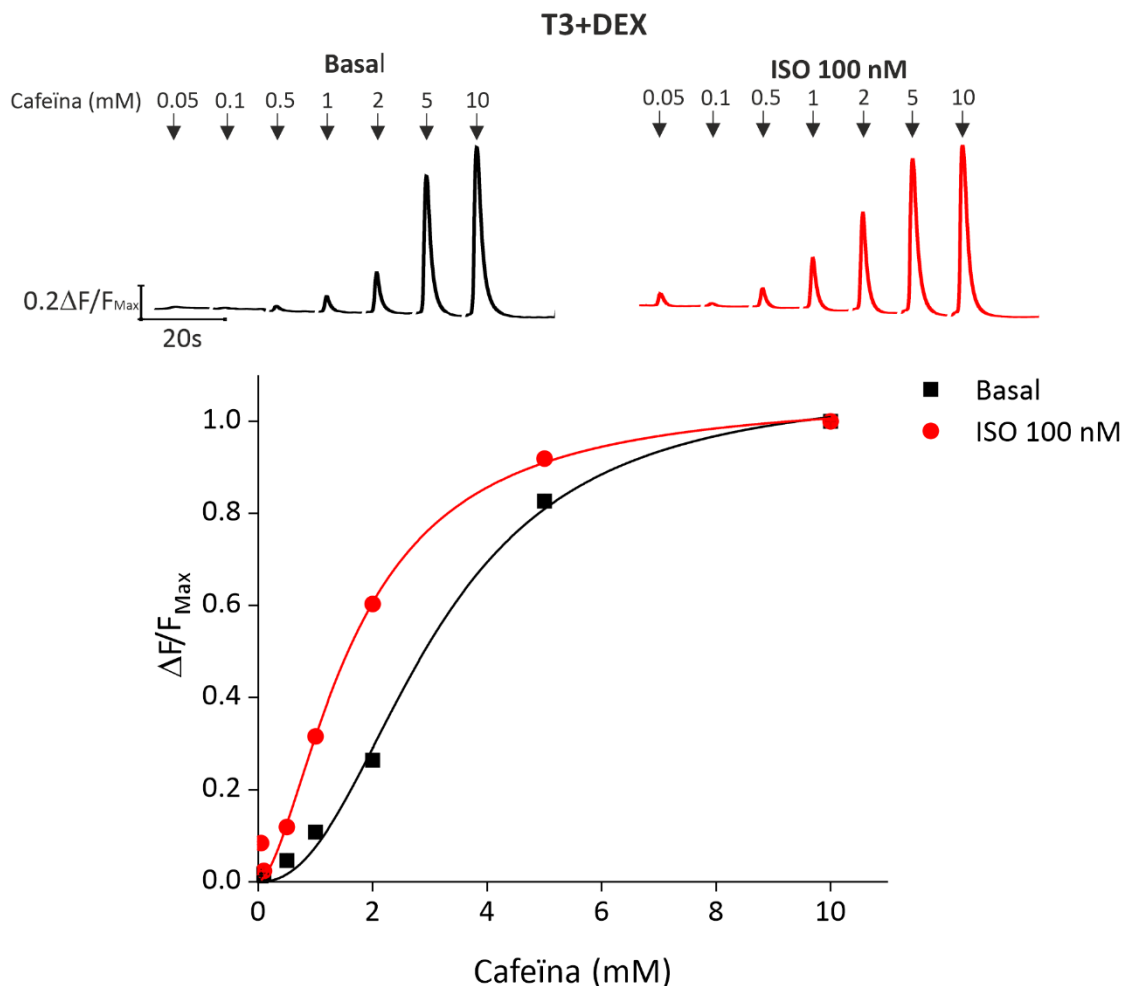
## Resultats



**Figura 31.** Els iPSC-CM de l'individu control sa no tractats mostren un lleuger augment de la sensibilitat a cafeïna en presència d'ISO 100 nM. A la part superior es mostra el traç representatiu de la resposta dels iPSC-CM no tractats en ambdues condicions a les diferents dosis de cafeïna. Els espais en blanc representen parades d'1 min en l'adquisició d'imatges. A la part inferior es mostra la mitjana $\pm$ ES de la resposta del iPSC-CM a cada una de les dosis de cafeïna i l'ajust a la funció de Hill (línia contínua) a aquests paràmetres en condicions basals i en estrès  $\beta$ -adrenèrgic.

En els iPSC-CM tractats amb T3+Dex es va observar que en presència de ISO 100 nM la quantitat de  $Ca^{2+}$  alliberada en concentracions submàximes de cafeïna era molt major comparada amb l'observada en els iPSC-CM no tractats (Figura 32 i Taula 31). Aquest fet indicava que els RYR2 presentaven una major sensibilitat a les concentracions de cafeïna submàximes donat per un augment de càrrega del reticle sarcoplasmàtic.

## Resultats



**Figura 32.** El tractament de T3+Dex induïx un augment de l'inotropisme als iPSC-CM en resposta a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. A la part superior es mostra el traç representatiu de la resposta dels iPSC-CM tractats amb T3+Dex en ambdues condicions a les diferents dosis de cafeïna. Els espais en blanc mostren aturades de 1 min en l'adquisició. A la part inferior es mostra la mitjana  $\pm$ ES de la resposta del iPSC-CM a cada una de les dosis de cafeïna i l'ajust a la funció de Hill (línia contínua) a aquests paràmetres en condicions basals i en estrès  $\beta$ -adrenèrgic.

**Taula 31.** La comparació dels ajustaments de les corbes de Hill entre condicions basal i ISO 100 nM mostra diferències significatives majors en els iPSC-CM tractats amb T3+Dex. Es mostra el p-valor de la comparació dels ajustaments de la corba de Hill i la concentració de cafeïna en la qual s'obté un 50% de la resposta màxima ( $K_d$  o també EC50).

Condicció	n	$K_d$ (mM)	p-valor
GPG1 No tractats Basal	2360	$2.92 \pm 0.32$	0.0351
GPG1 No tractats ISO 100 nM	2594	$2.40 \pm 0.33$	
GPG1 T3+Dex Basal	2166	$3.09 \pm 0.25$	0.0003
GPG1 T3+Dex ISO 100 nM	2278	$1.67 \pm 0.20$	

## Resultats

Aquests fets van mostrar que el tractament de T3+Dex descrit per Parikh i col·laboradors (2017)<sup>193</sup> induïa l'augment d'inotropisme en els iPSC-CM. Fet que mostrava l'augment de maduresa funcional dels iPSC-CM.

### **4. Estudis de l'acoblament E-C en iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S i del control sa**

Els resultats anteriors mostraven que el tractament de maduració induïa una millora funcional als iPSC-CM, per tant, augmentava la rellevància a nivell funcional del nostre model. Partint d'aquesta millora a nivell fisiològic ens vàrem proposar determinar si l'acoblament E-C es veia o no alterat per la presència de la mutació RYR2\_p.G357S en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació. Per tal de simular aquest procés fisiològic vam exposar els iPSC-CM, en condicions basal o en presència d'ISO 100 nM, a un pols quadrat positiu de 25 V durant 5 ms a 0.5 Hz per tal de despolaritzar els iPSC-CM i induir l'alliberació de  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic. Dels transitoris induïts es va mesurar: (1) durada al 50% del transitori, (2) el temps d'alliberació del 10 al 90% del transitori, (3) el temps de recaptació del 50-10% i del 90-10% del transitori, i (4) l'amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ ) que en aquest cas està formada pel  $\text{Ca}^{2+}$  entrant a través del sarcolemma i el  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat del reticle sarcoplasmàtic a través dels RYR2 (Apartat 3.7.2 de Materials i mètodes, Figura 18).

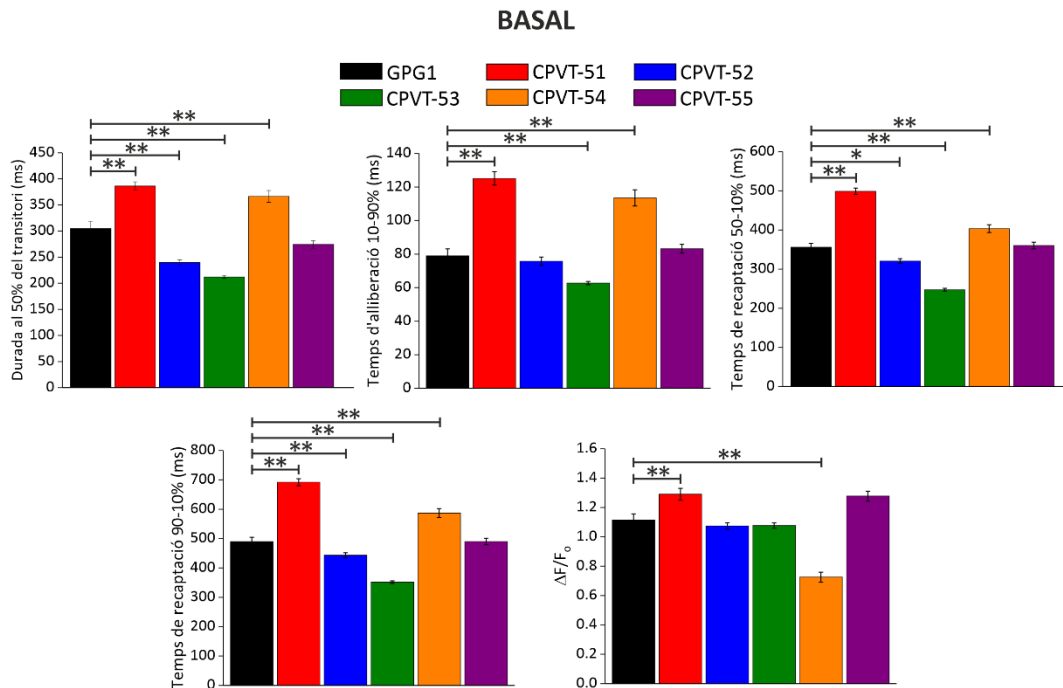
A nivell basal (Figura 33 i 35 esquerra) vam poder observar com els iPSC-CM de l'individu heterozigot CPVT-51 i de l'individu homozigot CPVT-54 presentaven una durada al 50% del transitori, un temps d'alliberació i un temps de recaptació tant a 50-10% com a 90-10% del transitori major comparat amb l'individu control sa. Tot i així els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostraven un augment de l'amplitud dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  respecte al control sa, fet que podria explicar l'augment dels paràmetres d'alliberació i recaptació respecte als iPSC-CM de l'individu control sa. En canvi, els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 presentaven una menor amplitud respecte dels iPSC-CM del control sa. Aquest fet mostrava una menor eficiència dels iPSC-CM d'aquest individu tant en l'alliberació com en la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Pel contrari, els iPSC-CM de l'individu heterozigot CPVT-52 i de l'individu homozigot CPVT-53 presentaven una reducció en la durada al 50% del transitori i en el temps de



## Resultats

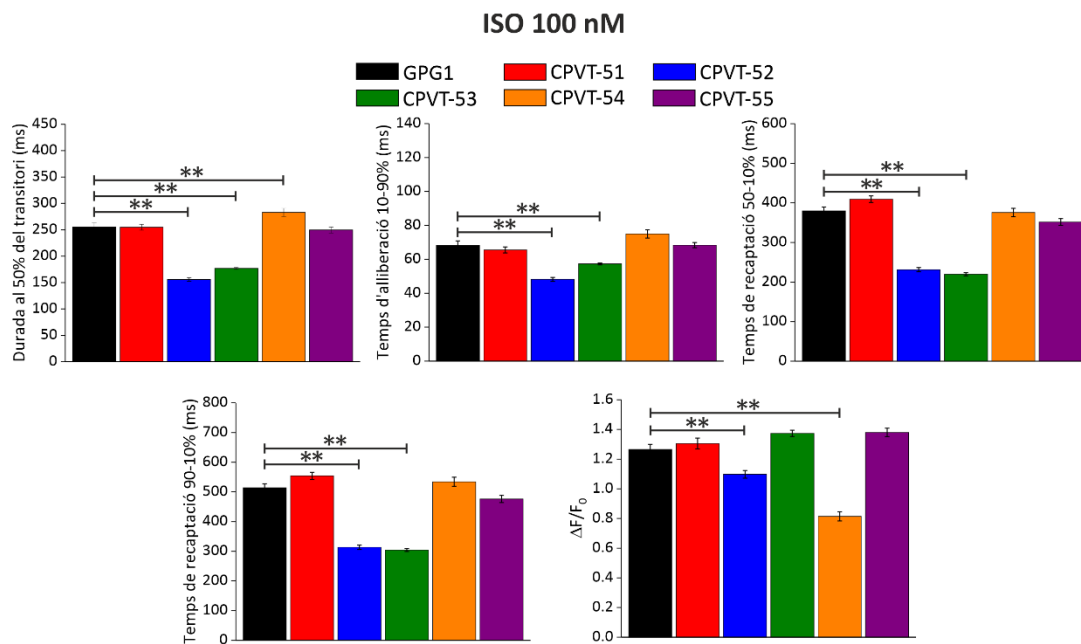
recaptació tant en el 50-10% com en el 90-10%. Únicament els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 van mostrar una disminució del temps d'alliberació respecte als iPSC-CM del control sa. Cap de les dues línies cel·lulars van mostrar diferències en l'amplitud del transitori. Tot i que els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 no va mostrar diferències en el temps d'alliberació, sí que es va observar que els transitoris d'ambdues línies cel·lulars eren més ràpids que els iPSC-CM de l'individu control sa.



**Figura 33.** Els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica a nivell basal mostren un patró línia específic. Es mostren les mitjanes  $\pm$  ES per a cada una de les línies per a tots els paràmetres analitzats dels transitoris. \*p-valor<0.05, \*\*p-valor<0.005 per *One-Way* ANOVA.

Després d'analitzar els transitoris a nivell basal es va voler determinar com aquests es veien afectats per la inducció d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic, exposant els iPSC-CM a ISO 100 nM (Figura 34 i 35 dreta). Referent als iPSC-CM de l'individu control sa, vam observar com els iPSC-CM l'individu heterozigot CPVT-52 i de l'individu homozigot CPVT-53 presentaven una reducció en la durada al 50% del transitori, del temps d'alliberació i del temps de recaptació al 50-10% i 90-10%. Únicament els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 van mostrar una reducció en l'amplitud del transitori. En canvi, els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 van mostrar un augment de la durada mitja del transitori i una reducció de l'amplitud del transitori.

## Resultats



**Figura 34.** L'aplicació d'ISO 100 nM no indueix l'aparició d'un patró específic entre els iPSC-CM dels individus portadors del mateix nombre d'al·lels mutats en els transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp. Es mostren les mitjanes $\pm$ ES per a cada una de les línies per a tots els paràmetres analitzats dels transitoris. \*p-valor<0.05, \*\*p-valor<0.005 per *One-Way* ANOVA.

Veient que no podíem determinar un patró de comportament per als iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, vàrem avaluar la resposta dels iPSC-CM de cada un dels individus a l'ISO 100 nM per veure si tenien la capacitat de respondre a l'estímul (Taula 32). El que vam observar és que a totes les línies s'observava la reducció del temps d'alliberació, possiblement associat a la fosforilació dels LTCC i RYR2 induïda per l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, i una reducció de la durada al 50% del transitori indicant un augment la capacitat de recaptació i, per tant, un augment en el lusitropisme.

En els iPSC-CM de l'individu control sa també es va observar un augment en l'amplitud del transitori. Aquests resultats indicaven que, a part del guany en el lusitropisme, els iPSC-CM de l'individu control sa també mostraven un augment de la capacitat inotrópica en presència d'ISO 100 nM.

Els iPSC-CM dels individus heterozigots CPVT-51 i CPVT-52 van mostrar una acceleració en la recaptació entre el 50-10% i 90-10% sense alteracions en l'amplitud del transitori

## Resultats

amb l'aplicació d'ISO 100 nM. En canvi, els iPSC-CM de l'altre individu heterozigot, el CPVT-55, van mostrar un augment de l'amplitud del transitori respecte l'estat basal.

Els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-54 mostraven una reducció del temps de recaptació 90-10% per l'aplicació d'ISO 100 nM. Tot i així, no es va poder observar un guany en l'inotropisme.

Finalment, els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-53 van mostrar una reducció dels temps de recaptació i un augment en l'amplitud del transitori per activació de la  $\beta$ -adrenèrgica.

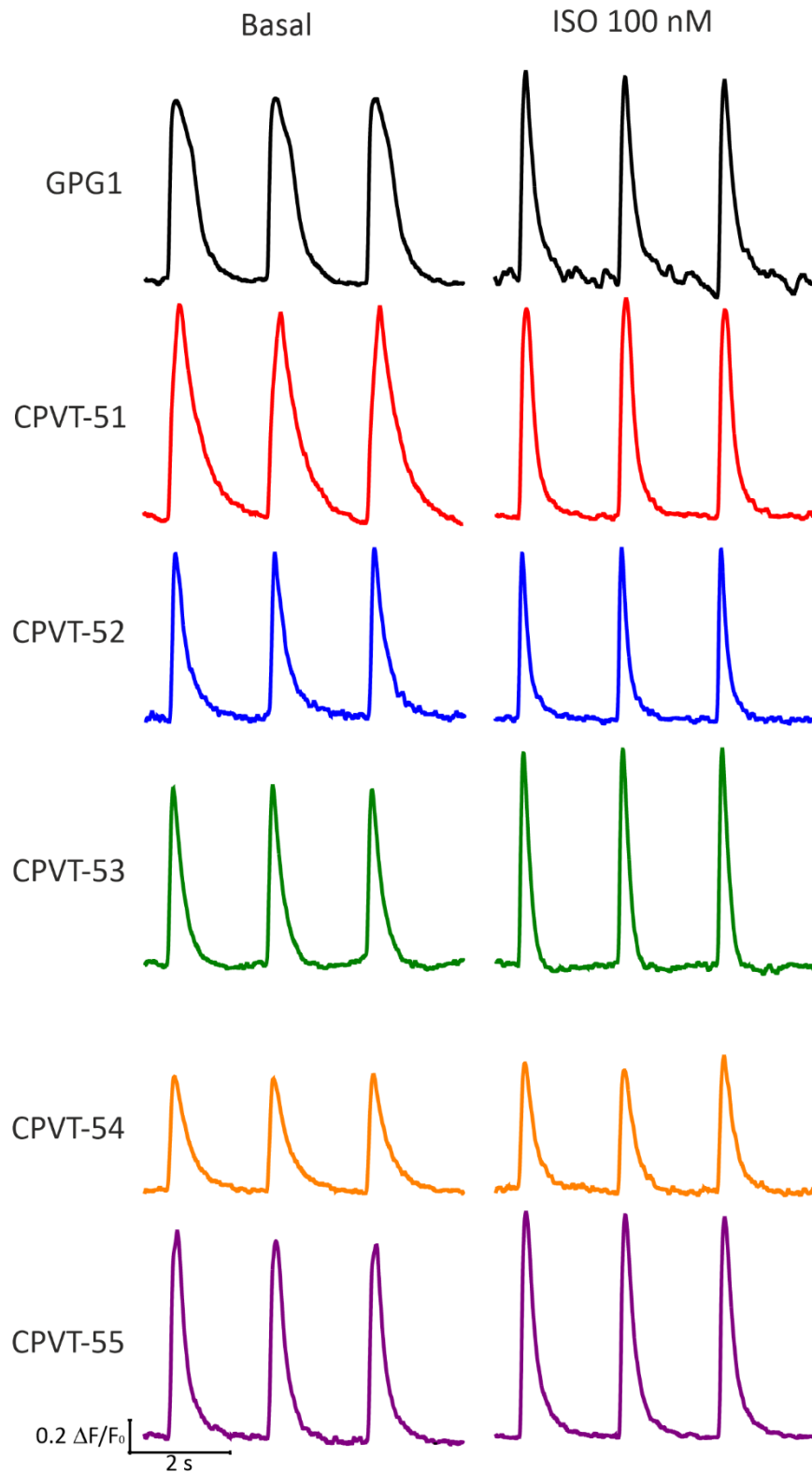
El que vam poder observar és que l'ISO 100 nM induïa un augment d'activitat lusitròpica de forma generalitzada. El que sí que ens va sorprendre, és que no totes les línies veien modificada l'activitat inotròpica. Únicament els iPSC-CM de l'individu control sa, de l'individu CPVT-53 i de l'individu CPVT-55 mostraven aquesta activitat.

### **Taula 32. La modificació en els paràmetres mesurats dels transitoris induïts per estimulació elèctrica no té un comportament associat al nombre d'al·lels amb la mutació RYR2\_p.G357S.**

Es mostren els p-valors de la comparació, mitjançant test-t, dels paràmetres en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM. El color verd indica disminució del paràmetre en presència de ISO 100 nM respecte l'estat basal. El color vermell indica augment dels valors del paràmetre respecte als valors en condicions basals.

Basal vs. ISO 100 nM					
	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
GPG1	0.0015	0.0289	0.0838	0.2309	0.0055
CPVT-51	7.17E-36	1.94E-36	9.42E-14	3.59E-15	0.7822
CPVT-52	6.92E-37	4.78E-22	6.30E-27	2.91E-30	0.4909
CPVT-53	2.98E-23	2.04E-6	8.09E-8	6.27E-12	7.36E-26
CPVT-54	1.77E-9	5.99E-12	0.0515	0.0137	0.0538
CPVT-55	0.0083	2.10E-06	0.4653	0.3976	0.0218

## Resultats

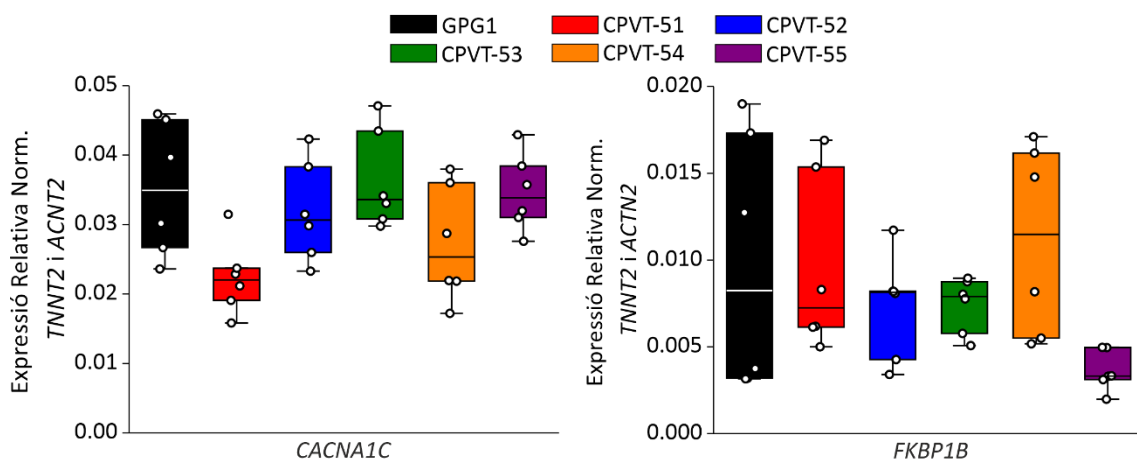


**Figura 35.** Traços de iPSC-CM representatius pels experiments de transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals (esquerra) i en presència d'ISO 100 nM (dreta).

## Resultats

Les comparacions dels paràmetres entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació, tant en condicions basals com en presència d'ISO 100 nM, no van mostrar patrons que es poguessin associar la presència de la mutació RYR2\_p.G357S en homozigosi o heterozigosi (Taula S3-S9). Tot i que tots els iPSC-CM mostraven resposta a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica, el comportament de les línies mostrava moltes diferències entre si. El conjunt d'aquests fets ens va portar a pensar que podria haver diferències d'expressió dels gens associats a l'acoblament E-C i a la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular que poguessin explicar aquesta variabilitat. Amb qPCR vam analitzar els nivells d'expressió dels gens codificants pels LTCC (gen *CACNA1C*), FKBP12.6 (gen *FKBP1B*), SERCA2 (gen *ATP2A2*), fosfolamban (gen *PLN*) i NCX1 (gen *SLC8A1*).

Els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S no van mostrar diferències en els nivells d'expressió dels gens involucrats en l'acoblament E-C, *CACNA1C* i *FKBP1B*, respecte als iPSC-CM de l'individu control sa (Figura 36).

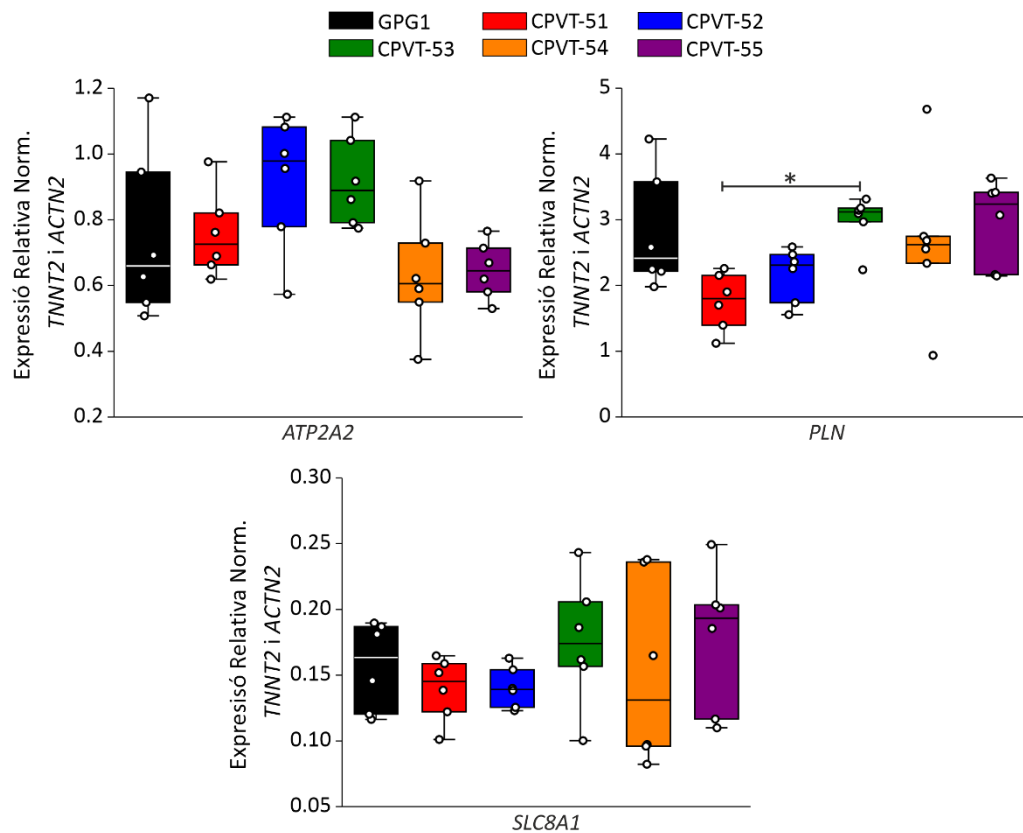


**Figura 36.** La mutació RYR2\_p.G357S no afecta als nivells de *CACNA1C* ni de *FKBP1B*. Es mostra la sobreposició d'un *dot plot*, mostrant el nivell d'expressió de cada una de les mostres normalitzats pels nivells de *TNNT2* i *ACTN2*, i un gràfic de caixes on es mostra la distribució dels nivells d'expressió de les diferents mostres analitzades. Significança analitzada amb Kruskal-Wallis ANOVA.

La mesura dels nivells d'expressió de gens involucrats en la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular (*ATP2A2* i de *SLC8A1*), va mostrar que els nivells d'aquests gens eren semblants entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació i de l'individu control sa. En el cas dels nivells de *PLN* vam poder determinar que els iPSC-CM de l'individu

## Resultats

CPVT-53 presentaven nivells d'expressió majors que els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 (Figura 37).



**Figura 37.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 presenten nivells superiors de *PLN* que els iPSC-CM de l'individu CPVT-51. Es mostra la sobreposició d'un *dot plot*, mostrant el nivell d'expressió de cada una de les mostres normalitzats pels nivells de *TNNT2* i *ACTN2*, i un gràfic de caixes on es mostra la distribució dels nivells d'expressió de les diferents mostres analitzades. \*p-valor<0.05 per Kruskal-Wallis ANOVA.

Aquests resultats indicaven que no hi havia diferències significatives d'expressió que poguessin explicar les diferències funcionals observades en els experiments anteriors. Tot i així cal tenir en compte que tot i que els nivells d'expressió entre línies fossin semblants, la immaduresa estructural dels iPSC-CM podia alterar l'acoblament E-C podent generar les diferències observades. L'eficiència de l'acoblament E-C és dependent de la densitat de díades i de l'organització estructural dins les mateixes entre els LTCC i RYR2. Per aquest motiu vàrem decidir induir els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lulars amb cafeïna, la qual és un lligand específic de RYR2, per tal de determinar possibles diferències funcionals entre les diferents línies cel·lulars.

## Resultats

### 5. Els transitoris de $\text{Ca}^{2+}$ induïts per cafeïna 10 mM mostren un guany de funció en els iPSC-CM dels individus RYR2\_p.G357S

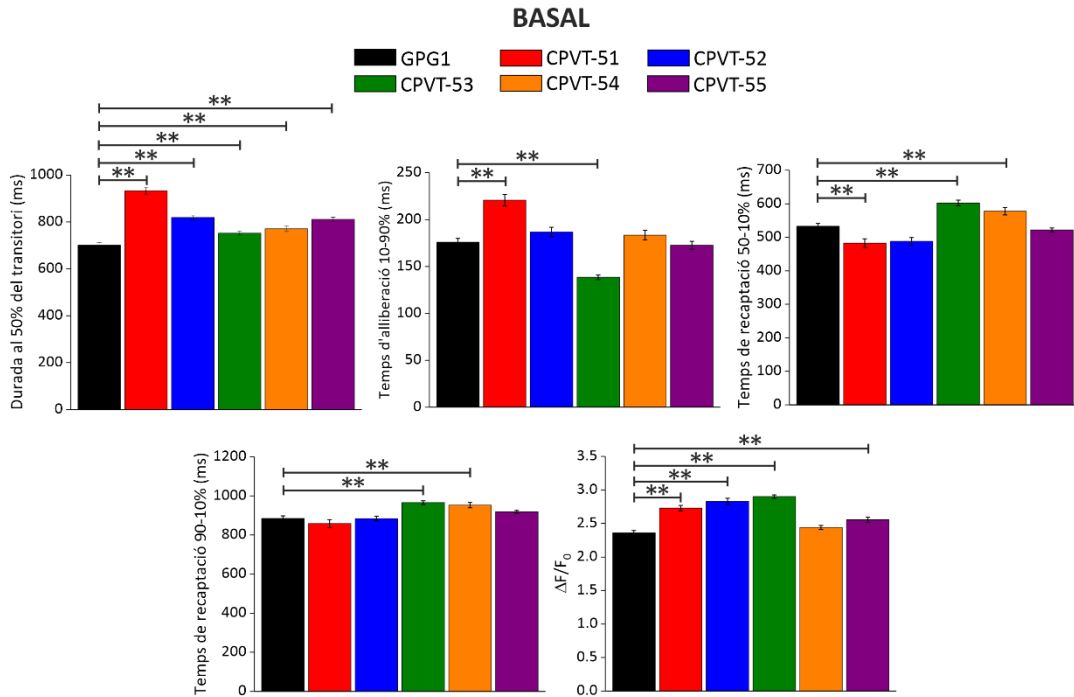
Per tal d'induir directament els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de RYR2, vam aplicar un pols d'1 seg de cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM. Dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  es van mesurar els mateixos paràmetres que en els experiments anteriors.

Els resultats en condicions basals (Figura 38 i 40 esquerra), respecte als iPSC-CM de l'individu control sa, van mostrar com els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S presentaven una major durada al 50% del transitori, mostrant que el canal ja es trobava més actiu. Els altres paràmetres per a cada un dels individus van presentar un comportament diferent respecte als iPSC-CM del control sa.

Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 van mostrar un temps d'alliberació i una amplitud del transitori major, i un temps de recaptació al 50-10% inferior. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 no van mostrar diferències respecte als iPSC-CM del control sa a nivell dels paràmetres cinètics, però si van mostrar un augment de l'amplitud dels transitori. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 van mostrar un menor temps d'alliberació, un augment del temps de recaptació tant al 50-10% com al 90-10%, i un augment en l'amplitud del transitori. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 van mostrar un augment del temps de recaptació tant al 50-10% com al 90-10%. Finalment, els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 van mostrar que els paràmetres cinètics eren semblants al control sa, mostrant únicament una major amplitud del transitori.

La major amplitud dels transitoris observada en els iPSC-CM dels individus CPVT-51, CPVT-52, CPVT-53 i CPVT-55 suggeria que les reserves de  $\text{Ca}^{2+}$  luminals en aquests iPSC-CM eren superiors a les dels iPSC-CM de l'individu control sa. Exceptuant els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 que tot i no mostrar més càrrega al reticle sarcoplasmàtic, la durada del transitori era superior. El que va cridar l'atenció és que l'individu CPVT-53, tot i tenir una de les càrregues de  $\text{Ca}^{2+}$  luminal més altes va presentar el temps d'alliberació més baix. Això podria estar indicant que el RYR2 es trobava més actiu.

## Resultats



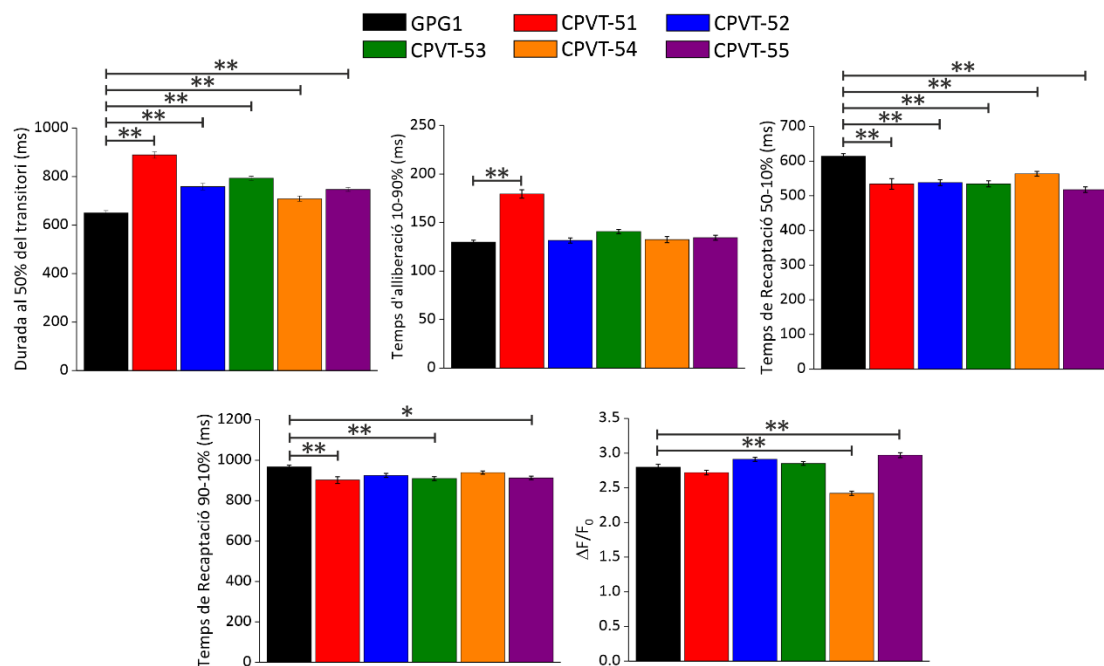
**Figura 38.** Els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals no mostren un patró associat al nombre d'al·lels mutats. Es mostren les mitjanes $\pm$ ES per a cada una de les línies per a tots els paràmetres analitzats dels transitoris. \*p-valor<0.05, \*\*p-valor<0.005 per *One-Way* ANOVA.

Seguidament, vam voler avaluar com els transitoris es veien modificats per l'aplicació d'ISO 100 nM (Figura 39 i 40 dreta). Els resultats, referent als iPSC-CM de l'individu control sa, varen mostrar com tots els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació presentaven una durada al 50% del transitori major i un menor temps de recaptació del 50-10%. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 van mostrar un augment del temps d'alliberació i una reducció del temps de recaptació 90-10%. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 van veure únicament modificat, a part dels paràmetres descrits, els temps de recaptació 90-10%. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 van mostrar la reducció de l'amplitud dels transitoris, mostrant que la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberada era inferior que en el control sa. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 van presentar una amplitud major i una reducció del temps de recaptació 90-10% que l'individu control sa.



## Resultats

### ISO 100 nM



**Figura 39.** L'aplicació d'ISO 100 nM no desemmascara un comportament comú entre els transitoris induïts per cafeïna 10 mM en els iPSC-CM d'individus amb el mateix nombre d'al·lels portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren les mitjanes $\pm$ ES per a cada una de les línies per a tots els paràmetres analitzats dels transitoris. \*p-valor<0.05, \*\*p-valor<0.005 per *One-Way ANOVA*.

La comparació entre els individus portadors de la mutació tant en homozigosis com en heterozigosis no mostraven patrons associats al nombre d'al·lels mutats (Taula S10 i S16). No obstant això, vàrem poder observar un guany de funció superior, major durada al 50% del transitori, en els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 respecte als iPSC-CM als dels altres individus portadors de la mutació en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM. Comparant la durada al 50% del transitori dels iPSC-CM dels individus CPVT-52 i CPVT-53, amb relació de parentesc de segon grau, es va observar que en condicions basals la durada era major a l'individu CPVT-52. Però en presència d'ISO 100 nM la funció es veia igualada entre els iPSC-CM dels dos individus.

Finalment, vam voler determinar com cada una de les línies d'iPSC-CM responia a l'estímul  $\beta$ -adrenèrgic. La comparació entre condicions basals i ISO 100 nM per a cada un dels individus es mostra a la Taula 33. Es va poder observar com els iPSC-CM de l'individu control sa GPG1 mostraven una disminució de la durada al 50% del transitori,

## Resultats

i del temps d'alliberació respecte les condicions basals. En canvi, es va veure com el temps de recaptació del 50-10% i del 90-10% augmentava. Possiblement, la causa de l'alentiment en la recaptació va ser donada per la major amplitud del transitori, causat per l'augment de l'inotropisme en aquest individu. Tot i que el temps de recaptació era més lent i el  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat més abundant no es va augmentar la durada mitja del transitori sinó que es va veure reduïda.

Els iPSC-CM dels individus heterozigots CPVT-51 i CPVT-52 van mostrar una reducció de la durada al 50% del transitori i del temps d'alliberació. Els temps de recaptació, però, van resultar ser majors tot i no veure augmentat l'amplitud del transitori.

Els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-53 van mostrar un augment en la durada al 50% dels transitori. En canvi, van veure reduït el temps de recaptació sense efecte en l'amplitud del transitori. Aquesta resposta a l'ISO 100 nM va ser contrària a l'efecte observat en els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp.

Finalment, els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-54 i de l'individu heterozigot CPVT-55 van mostrar una reducció en el temps d'alliberació i en la durada al 50% del transitori, mostrant un augment en el lusitropisme induït per l'aplicació de l'ISO 100 nM. Tot i així, els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 van veure augmentada l'amplitud del transitori, mostrant un guany en l'inotropisme, fet que no va tenir influència en la capacitat de recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$ .

Els únics iPSC-CM que van veure modificada la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  emmagatzemada dins el reticle sarcoplasmàtic per l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica van ser els iPSC-CM de l'individu control sa GPG1 i CPVT-55. Aquest fet mostra que ambdós individus presentaven un augment en l'inotropisme en resposta  $\beta$ -adrenèrgica. En canvi, els altres individus no van veure modificada la càrrega del reticle sarcoplasmàtic. Això podria ser degut a que la càrrega del reticle sarcoplasmàtic ja es trobava a nivells màxims des de l'estat basal en els individus CPVT-51, CPVT-52, CPVT-53 i CPVT-54.

## Resultats

**Taula 33. La modificació en els paràmetres mesurats dels transitoris induïts per un pols de cafeïna 10 mM no tenen un comportament associat al nombre d'al·lels amb la mutació RYR2\_p.G357S.** Es mostren els p-valors de la comparació, mitjançant test-t, dels paràmetres en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM. El color verd indica disminució del paràmetre respecte l'estat basal. El color vermell indica augment dels valors del paràmetre respecte als valors en condicions basals.

Basal vs. ISO 100 nM					
	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
<b>GPG1</b>	0.0005	1.04E-24	2.07E-12	2.01E-7	1.14E-14
<b>CPVT-51</b>	0.0267	4.12E-8	0.0088	0.0902	0.8594
<b>CPVT-52</b>	0.0004	2.21E-21	0.0003	0.0093	0.1359
<b>CPVT-53</b>	0.0009	0.5124	6.99E-8	0.0001	0.1580
<b>CPVT-54</b>	0.0001	1.47E-16	0.2670	0.3706	0.6406
<b>CPVT-55</b>	1.00E-7	7.33E-15	0.6691	0.61230	2.68E-15

## Resultats

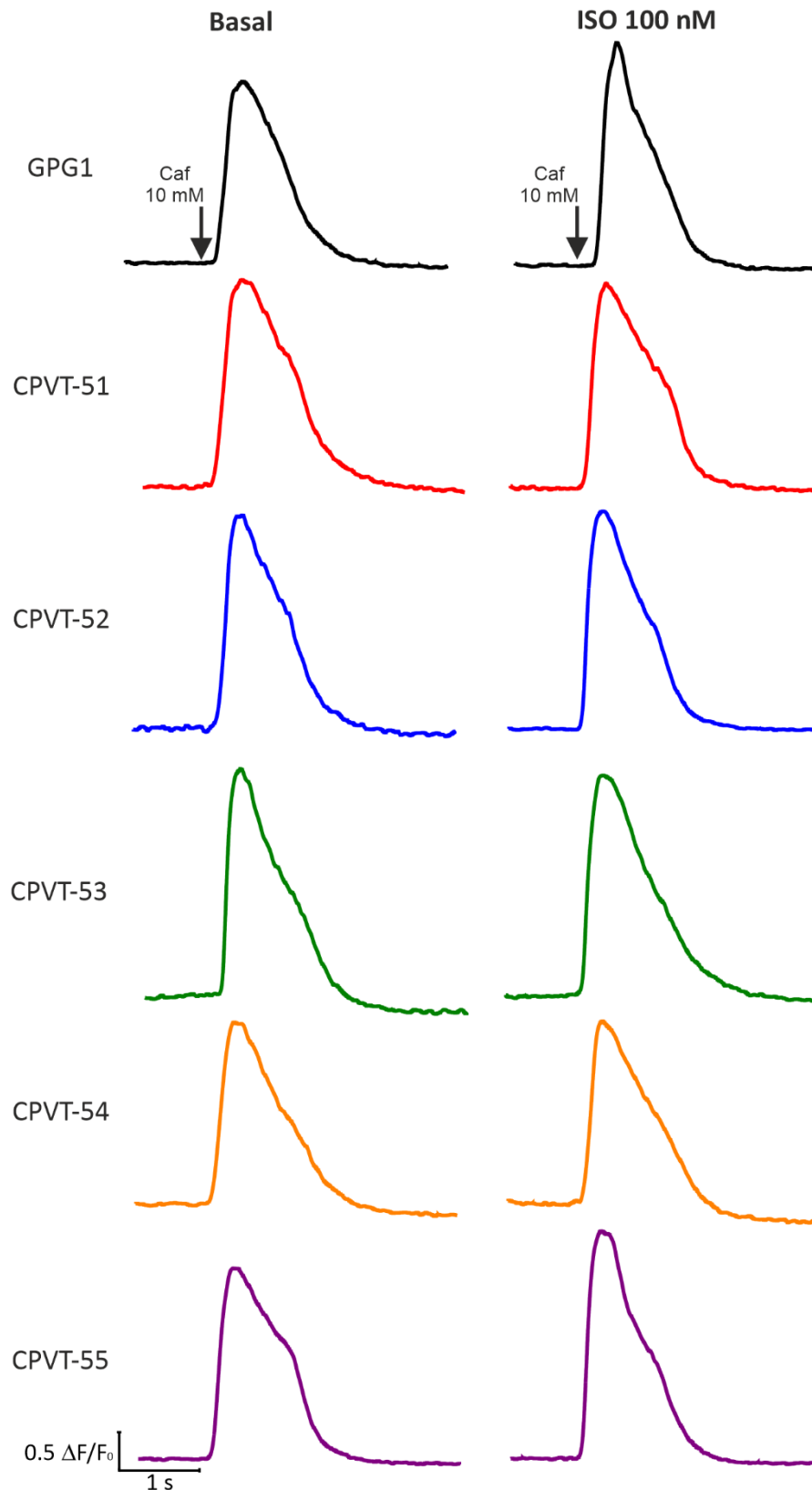


Figura 40. Traços d'iPSC-CM representatius pels experiments d'inducció de transitoris de Ca<sup>2+</sup> per cafeïna 10 mM en condicions basals (esquerra) i en presència d'ISO 100 nM (dreta).

## Resultats

Aquests experiments van mostrar tant en condicions basals com en presència d'ISO 100 nM, com els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S mostraven una durada al 50% del transitori molt major respecte als iPSC-CM de l'individu control sa. Indicant que els RYR2 d'aquests individus es trobaven més temps oberts, i per tant que presentaven un guany de funció. En el cas dels iPSC-CM de l'individu CPVT-53 aquests van mostrar un temps d'alliberació molt inferior als iPSC-CM del control sa en condicions basals, i era l'únic que veia augmentada la durada al 50% del transitori en presència d'ISO 100 nM respecte als valors basals. Indicant que els iPSC-CM d'aquests individus presentaven un guany de funció major respecte als altres iPSC-CM dels individus portadors de la mutació.

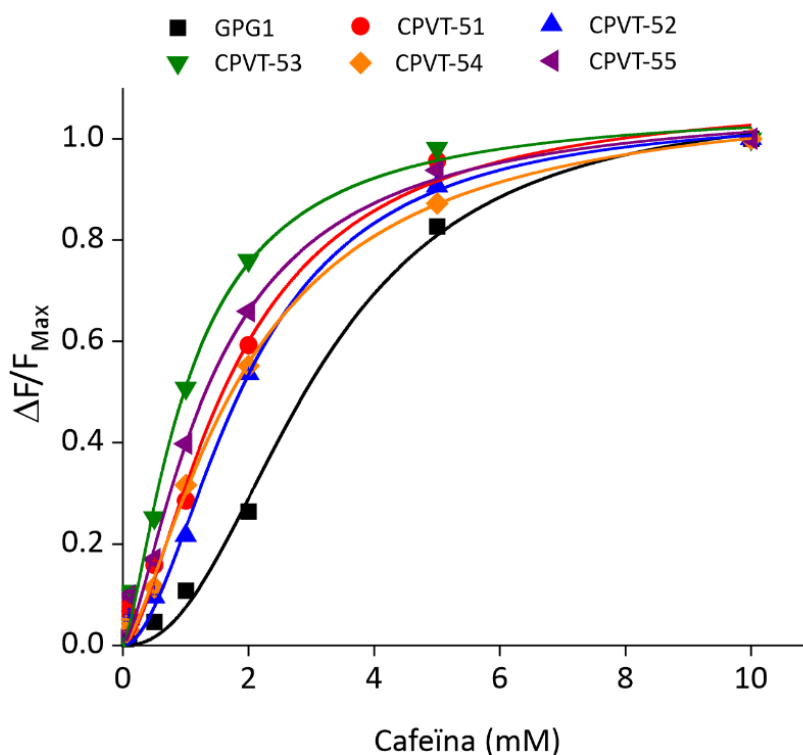
Finalment, ens vàrem proposar realitzar experiments per mesurar de forma més precisa l'activitat del RYR2, per determinar si podíem observar canvis en la funció de RYR2 entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació.

### **6. La mutació RYR2\_p.G357S indueix un guany de funció sense necessitat de l'activació de la via $\beta$ -adrenèrgica**

La mesura del  $\text{Ca}^{2+}$  alliberat per l'aplicació de concentracions creixents de cafeïna ha estat utilitzada clàssicament per mesurar l'activitat del RYR2. Mitjançant la realització de corbes concentració-resposta es va voler mesurar com la mutació modificava l'activitat del RYR2 en condicions basal i en situacions d'estrès  $\beta$ -adrenèrgic.

La comparació dels ajustaments de Hill a les corbes concentració-resposta de cafeïna en condicions basals (Figura 41, 43 Esquerra i Taula 34) va mostrar com els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S es desplaçaven cap a l'esquerra. Mostrant un augment de la sensibilitat a cafeïna dels RYR2, fet que indicava que la mutació induïa un guany de funció dels RYR2 observable ja en condicions basals. Comparant les corbes concentració-resposta entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, vàrem observar com els iPSC-CM de l'individu homozigot per la mutació CPVT-53 presentaven una major sensibilitat a cafeïna comparat amb els iPSC-CM dels individus heterozigots CPVT-51, CPVT-52 i de l'individu homozigot CPVT-54. També es va poder determinar que els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 presentaven una major sensibilitat respecte als iPSC-CM de l'individu CPVT-52.

## Resultats



**Figura 41.** Els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S mostren un augment de la sensibilitat a cafeïna respecte als iPSC-CM de l'individu control sa en condicions basals. Es mostra l'ajust de la corba de Hill (línia contínua) als valors mitjans $\pm$ ES de la resposta dels iPSC-CM a cada una de les dosis de cafeïna aplicades en condicions basals.

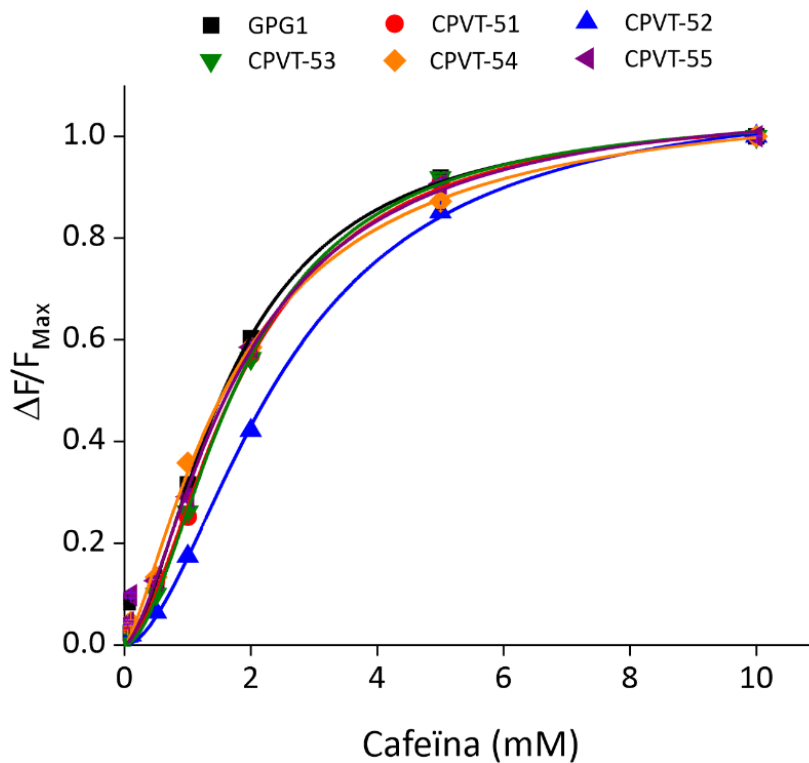
**Taula 34.** Comparació dels valors de  $K_d$  de les diferents corbes concentració-resposta dels iPSC-CM de l'individu control sa i dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren els p-valors de la comparació dels ajustaments de les corbes de Hill.

	GPG1	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
<b>GPG1</b> ( $K_d=3.09\pm 0.25$ mM)					
<b>CPVT-51</b> ( $K_d=1.77\pm 0.30$ mM)	0.0010				
<b>CPVT-52</b> ( $K_d=1.97\pm 0.15$ mM)	0.0006	0.3345			
<b>CPVT-53</b> ( $K_d=1.06\pm 0.13$ mM)	1.00E-05	0.0160	0.0003		
<b>CPVT-54</b> ( $K_d=1.96\pm 0.18$ mM)	7.00E-05	0.6962	0.1434	0.0007	
<b>CPVT-55</b> ( $K_d= 1.45\pm 0.20$ mM)	6.00E-05	0.4241	0.0106	0.0906	0.0549

Tot i que el guany de funció de la mutació ja es podia observar a nivell basal, vam voler determinar si podia ser augmentat amb l'aplicació d'ISO 100 nM. Les corbes

## Resultats

concentració-resposta de cafeïna en presència d'ISO 100 nM (Figura 42, 43 dreta) no van mostrar cap augment de funció dels RYR2 dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S respecte al control sa (Taula 35). Únicament els iPSC-CM de l'individu control sa van mostrar un augment significatiu de la funció dels RYR2, tal com ja havíem mostrat anteriorment (Taula 35). El que vam observar és que els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostraven una funció menor respecte als iPSC-CM de la resta d'individus (Taula 35). També els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 van mostrar una funció menor respecte als iPSC-CM de l'individu CPVT-54.



**Figura 42.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren una disminució de la sensibilitat a cafeïna respecte als iPSC-CM dels altres individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S i de l'individu control sa. Es mostra l'ajust de la corba de Hill (línia contínua) als valors mitjans $\pm$ ES de la resposta dels iPSC-CM a cada una de les dosis de cafeïna aplicades en presència d'ISO 100 nM.

## Resultats

**Taula 35. Comparació de  $K_d$  de les corbes concentració-resposta en condicions ISO 100 nM dels iPSC-CM del control sa i dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostra el p-valor de la comparació de l'ajustament de la corba de Hill entre els diferents individus.**

	GPG1	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
<b>GPG1</b> ( $K_d=1.67\pm 0.20$ mM)					
<b>CPVT-51</b> ( $K_d=1.86\pm 0.14$ mM)	0.6502				
<b>CPVT-52</b> ( $K_d=2.54\pm 0.12$ mM)	0.0037	0.0013			
<b>CPVT-53</b> ( $K_d=1.84 \pm 0.07$ mM)	0.4969	0.9479	0.0001		
<b>CPVT-54</b> ( $K_d=1.80\pm 0.20$ mM)	0.7029	0.1609	0.0002	0.0394	
<b>CPVT-55</b> ( $K_d= 1.83\pm 0.31$ mM)	0.9658	0.8849	0.0166	0.7444	0.8456

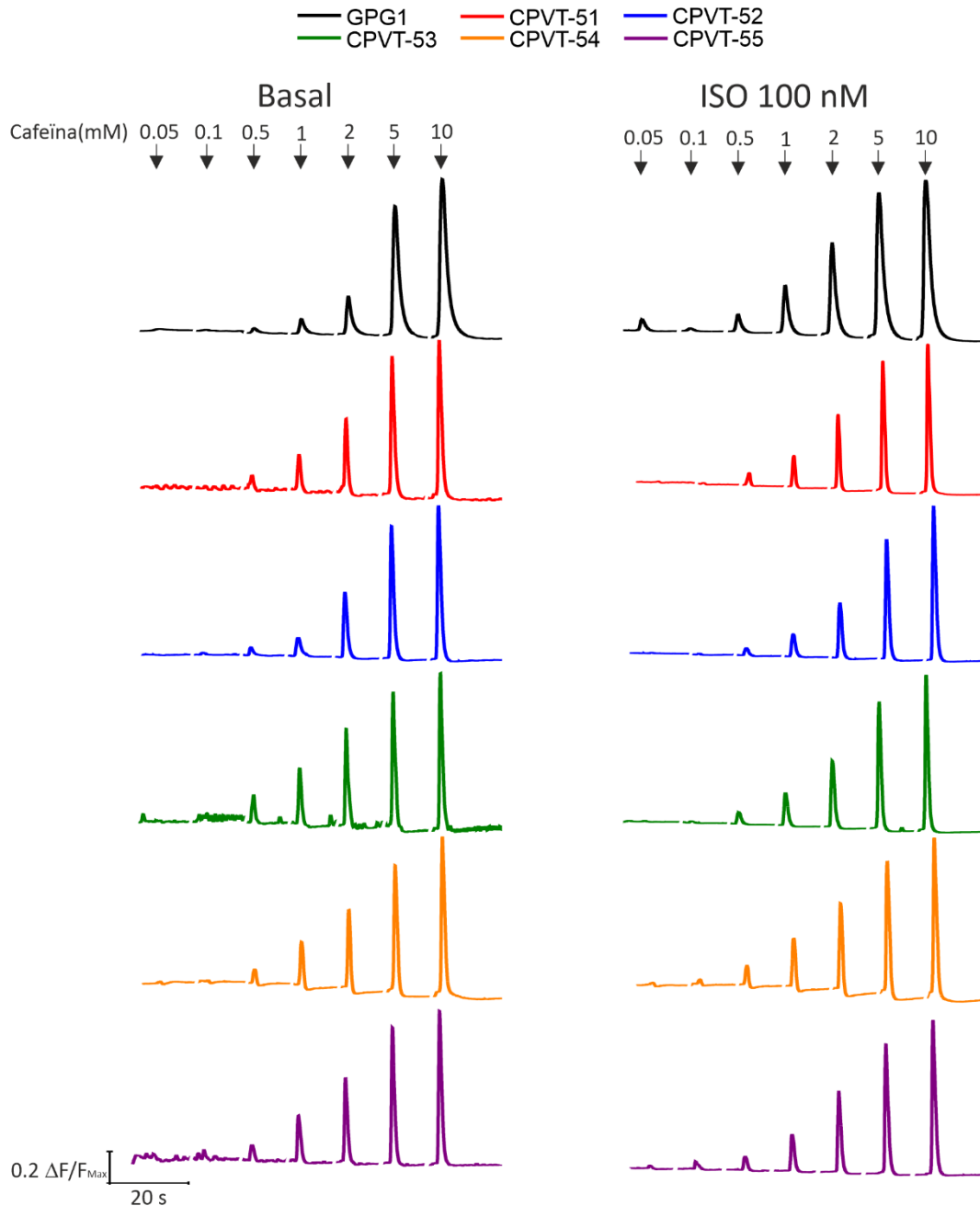
La comparació dels ajustaments de Hill de les corbes concentració-resposta entre condicions basals i en presència d'ISO 100 nM (Taula 36), van mostrar com els iPSC-CM dels individus CPVT-52 i CPVT-53 eren els únics que veien disminuïda la seva funció en presència d'ISO 100 nM.

**Taula 36. Comparació de les  $K_d$  entre condició basal i en presència d'ISO 100 nM per als iPSC-CM del diferents individus. Es mostra la comparació dels ajustaments de la corba de Hill, entre condicions basals i ISO 100 nM dels iPSC-CM de cada individu, i la seva  $K_d$  per a cada una de les corbes concentració-resposta.**

	n Basal	$K_d$ Basal (mM)	n ISO 100 nM	$K_d$ ISO 100 nM (mM)	p-valor
<b>GPG1</b>	2166	3.09±0.25	2278	1.67±0.20	0.0003
<b>CPVT-51</b>	877	1.77±0.30	1459	1.86±0.14	0.7480
<b>CPVT-52</b>	1856	1.97±0.15	2065	2.54±0.12	0.0180
<b>CPVT-53</b>	2013	1.06±0.13	730	1.84 ±0.07	2.23E-04
<b>CPVT-54</b>	652	1.96±0.18	564	1.80±0.20	0.4895
<b>CPVT-55</b>	1736	1.45±0.20	1319	1.83±0.31	0.2752



## Resultats



**Figura 43.** Traços representatius de la mitjana de tots els iPSC-CM analitzats en els experiments de concentració-resposta de cafeïna en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM per a tots els individus. Es mostra per a cada un dels individus la mesura de fluorescència ( $\Delta F/F_{Max}$ ) com a resposta a cada una de les dosis de cafeïna. Els espais en blanc representen aturades en l'adquisició de 1min.

Els resultats van mostrar que els RYR2 dels iPSC-CM de l'individu control sa GPG1 responien de forma fisiològica a l'ISO 100 nM incrementant la quantitat de  $Ca^{2+}$  alliberada en cada una de les dosis de cafeïna submàximes. L'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica produeix l'augment de cronotropisme, lusitropisme i inotropisme necessari

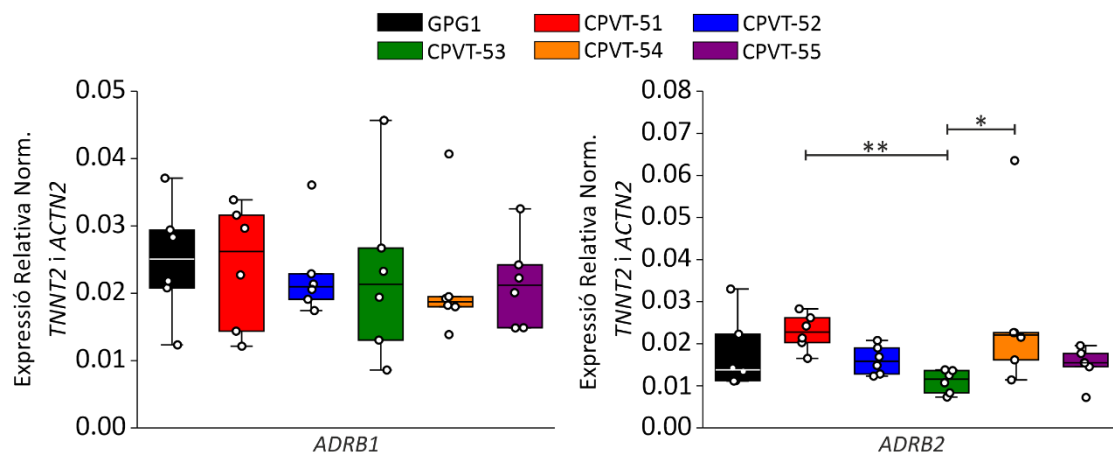
## Resultats

per donar resposta a les demandes metabòliques en situacions d'estrès.<sup>10,21</sup> En el cas de la CPVT, aquesta activació és la responsable de generar les arrítmies ventriculars malignes que poden derivar a MSC.<sup>60-64</sup> Els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S d'aquest estudi presentaven un guany de funció dels RYR2 a nivell basal que no era possible superar amb l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica.

A l'observar la insensibilitat a l'ISO 100 nM dels RYR2 dels iPSC-CM dels individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55, i la resposta aberrant dels iPSC-CM dels individus CPVT-52 i CPVT-53 vam voler determinar si els nivells d'expressió de gens implicats en la generació de la resposta  $\beta$ -adrenèrgica eren diferents segons la línia cel·lular.

Mitjançant qPCR, vam avaluar els nivells d'expressió dels gens *ADRB1* (receptor adrenèrgic  $\beta$ 1), *ADRB2* (receptor adrenèrgic  $\beta$ 2) i *CAMK2A* (quinasa dependent de calmodulina II). No es van trobar diferències en els nivells d'expressió del gen *ADRB1* entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació respecte als iPSC-CM de l'individu control sa, ni entre les línies dels individus portadors de la mutació (Figura 44 esquerra).

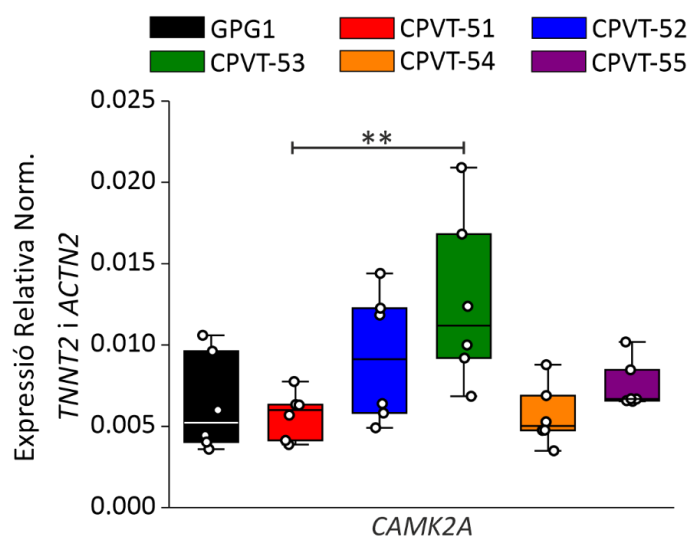
En quant al gen *ADRB2*, es va observar que els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 presentaven un nivell més baix d'expressió respecte als iPSC-CM dels individus CPVT-51 i CPVT-54 (Figura 44 dreta).



**Figura 44.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren nivells inferiors d'*ADRB2* respecte als iPSC-CM dels individus CPVT-51 i CPVT-54, però no veu modificats els seus nivells d'*ADRB1*. Es mostren els gràfics de caixes i el nivell d'expressió per a cada una de les mostres (o) (n=6). \* p-valor <0.05, \*\*p-valor<0.01 obtingut per Kruskal-Wallis ANOVA.

## Resultats

Seguidament, vam voler avaluar si hi havia modificacions en els nivells de *CAMK2A*. S'ha demostrat en models animals que la fosforilació del residu S2814 és necessària per a l'augment de funció associada als estímuls  $\beta$ -adrenèrgics.<sup>109,110</sup> També s'ha vist que en models de ratolí transgènic l'augment d'expressió de *CAMK2A* promou la generació de *sparks* de  $\text{Ca}^{2+}$ .<sup>108</sup> Els resultats van mostrar que els nivells de *CAMK2A* dels iPSC-CM de l'individu control sa i dels portadors de la mutació RYR2\_p.G357S no eren diferents (Figura 45). L'única diferència significativa va ser que els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 presentava nivells de *CAMK2A* superiors als iPSC-CM de l'individu CPVT-51.



**Figura 45.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren nivells superiors de *CAMK2A* respecte als iPSC-CM de l'individu CPVT-51. Es mostren els gràfics de caixes i el nivell d'expressió per a cada una de les mostres (o). \*\*p-valor<0.01 obtingut per Kruskal-Wallis ANOVA.

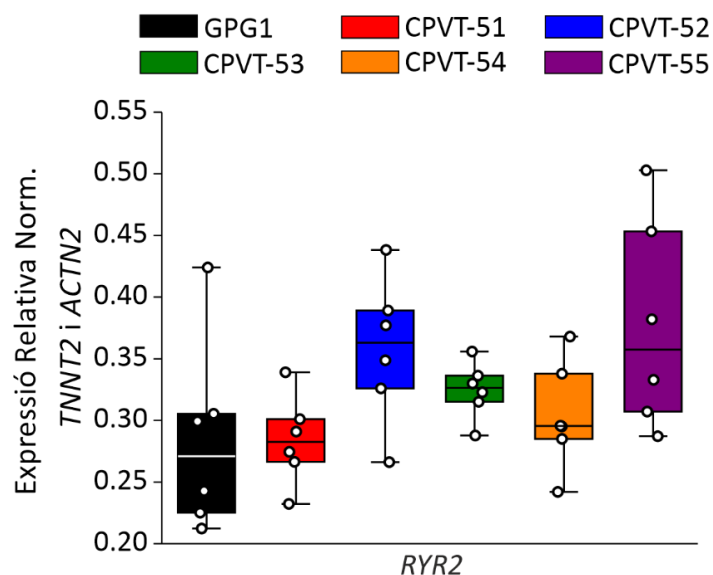
Tots els resultats en conjunt van mostrar que la mutació RYR2\_p.G357S en estat basal generava un guany de funció al RYR2, que no podia ser augmentat amb l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica. Els nivells d'expressió d'*ADRB1*, *ADRB2* i *CAMK2A* no explicarien la insensibilitat de la resposta a ISO 100 nM o la disminució de la funció observada, ja que els nivells d'expressió dels individus portadors eren semblants als de l'individu control sa.

## Resultats

### 7. La mutació RYR2\_p.G357S no indueix canvis en la quantitat de proteïna de RYR2

Les corbes concentració-resposta de cafeïna en estat basal mostraven com els RYR2 dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S mostraven un guany de funció. Aquest guany de funció podria ser degut a un augment de la quantitat de RYR2 present en el reticle sarcoplasmàtic o a un augment de la  $P_o$  del canal. Liu i col·laboradors (2017) van suggerir que la mutació desestabilitzava l'estructura del domini N-terminal del RYR2, podent ser la causant del guany de funció observat i al mateix temps disminuïa la quantitat de RYR2, pèrdua de funció.<sup>180</sup>

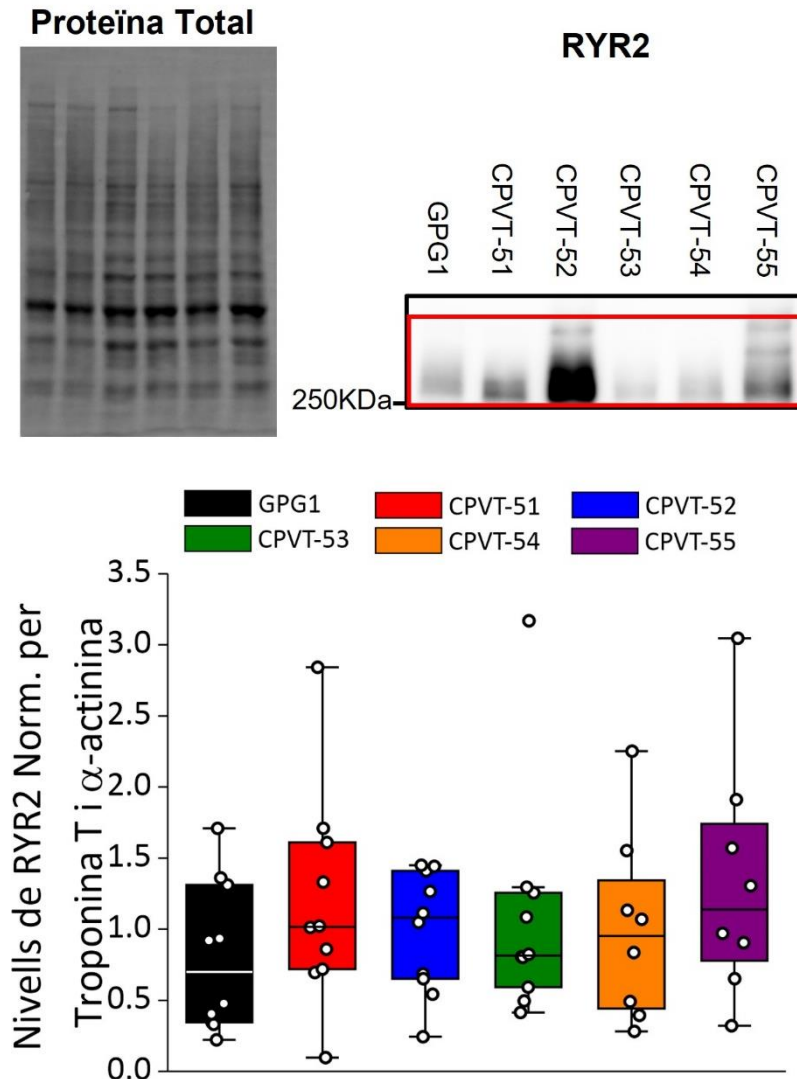
Per determinar l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S sobre l'expressivitat, vam realitzar experiments de qPCR per determinar els nivells d'expressió del gen *RYR2* en els iPSC-CM de l'individu control sa i dels portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en homozigosi i heterozigosi. L'anàlisi dels nivells d'expressió no va mostrar diferències entre els iPSC-CM de l'individu control sa i els portadors de la mutació RYR2\_p.G357S ni entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació (Figura 46).



**Figura 46.** Els nivells d'expressió de *RYR2* són iguals tant en els iPSC-CM de l'individu control sa com en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Sobreposició del dot plot que mostra el nivell d'expressió relatiu ( $2^{-\Delta Ct}$ ) normalitzats per *TNNT2* i *ACTN2* de cada una de les diferenciacions independents analitzades i el gràfic de caixes on es mostren la distribució dels nivells d'expressió dels diferents individus (n=6). Significança analitzada per Kruskal-Wallis ANOVA.

## Resultats

Un cop determinat que l'expressivitat no es veia afectada per la mutació RYR2\_p.G357S, vam voler determinar si els nivells de proteïna del RYR2 es veien afectats. Els experiments de western blot no van mostrar diferències significatives en la quantitat de RYR2 entre els iPSC-CM de l'individu sa i els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, ni entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació en si (Figura 47).



**Figura 47.** Els nivells de RYR2 no es veuen alterats per la mutació RYR2\_p.G357S. A la part superior es mostra la proteïna total de les mostres (esquerra) i la detecció per western blot de RYR2 (dreta). A la part inferior es mostra la sobreposició d'un *dot plot* que mostra el nivell de RYR2 de cada una de les mostres i un gràfic de caixes que mostra la distribució dels nivells de RYR2 de les diferenciacions independents dels diferents individus (GPG1 n=10, CPVT-51 n=10, CPVT-52 n=10, CPVT-53 n=10, CPVT-54 n=8 i CPVT-55 n=8). Significança analitzada per Kruskal-Wallis ANOVA.

## Resultats

En el nostre model d'iPSC-CM, els resultats de qPCR i western blot van mostrar que la mutació no afecta ni a l'expressivitat ni a la quantitat de RYR2, en contraposició als resultats obtinguts mitjançant expressió heteròloga per Liu i col·laboradors (2017).<sup>180</sup>

Els nostres resultats suggereixen que el guany de funció detectat en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, tant en homozigosi com en heterozigosi, en condicions basals no és causat per un augment de la quantitat de proteïna.

### **8. Estudi del patrimoni genètic dels individus mitjançant la seqüenciació del genoma sencer**

Com ja hem explicat anteriorment, els fenotips clínics dels individus seleccionats per aquest estudi, tot i ser portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, són diversos. Per tant, és interessant analitzar la possible contribució del patrimoni genètic individual en la modificació tant del fenotip clínic dels individus com en el fenotip observat a nivell cel·lular en les seves corresponents línies d'iPSC-CM.

Així mateix, el nostre anàlisi dels genomes es va focalitzar en dues comparacions que podrien informar sobre la contribució del patrimoni genètic: (1) es van comparar els individus CPVT-51 i CPVT-55, que són germans i són heterozigots per la mutació i (2) els individus CPVT-52, heterozigot, i CPVT-53, homozigot, que són familiars de segon grau (primera i tercera generació, respectivament). En el cas (1) l'individu CPVT-51 va patir un episodi de presíncope a 19 anys i una MSC recuperada a 21 anys, mentre que l'individu CPVT-55 era asimptomàtic. En el cas (2), l'individu CPVT-52 va patir un síncope a 39 anys, mentre que l'individu CPVT-53 va patir un síncope a 8 anys.

Per a tots dos anàlisis, ens vàrem centrar en l'estudi de variants de canvi de sentit, de codó STOP prematur i de codó d'inici prematur en 140 gens associats a malalties arritmogèniques. A l'annex 1 es troben les posicions genòmiques i la seqüència de referència per a cada una de les variants identificades (Taula S17).

#### **8.1. Variants trobades a l'individu CPVT-51**

La severitat del fenotip de l'individu CPVT-51 respecte a l'individu CPVT-55, suggeria que l'individu CPVT-51 podria ser portador d'algun factor genètic que el fes més susceptible

## Resultats

a l'arritmogènesi. Per aquest motiu vàrem descartar les variants compartides amb els altres tres individus portadors de la mutació, i vàrem mirar quines variants tenia l'individu CPVT-51 que no fossin presents en l'individu CPVT-55. Les variants úniques trobades en aquest individu es mostren a la Taula 37. Tres de les variants van ser identificades en gens de proteïnes estructurals cardíques (*DSP*, *MYH6* i *TTN*) i una al gen codificant per canal de sodi Nav1.9 (gen *SCN11A*) el qual no s'expressa en el cor.

**Taula 37. Variants úniques identificades en el genoma de l'individu CPVT-51.** "B" indica que la variant és benigne. "VSI" indica que la variant és de significat incert.

Gen	Tipus de Variant	Variant de nucleòtid	Variant aminoàcid	Freqüència (%)	Classificació
<i>DSP</i>	Canvi de sentit	c.C4609T	p.R1537C	1.45	B
<i>MYH6</i>	Canvi de sentit	c.G166A	p.G56R	8.21	B
<i>SCN11A</i>	Canvi de sentit	c.A5366G	p.H1789R	4E-0.4	VSI
<i>TTN</i>	Canvi de sentit	c.G51662A	p.R17221H	7.1E-0.4	VSI

### 8.2. Variants comunes dels individus CPVT-52 i CPVT-53

Els iPSC-CM dels individus CPVT-52 i CPVT-53 mostraven un guany de funció en condicions basal, i la disminució de la funció dels RYR2 en presència d'ISO 100 nM. Aquest comportament semblant i el parentesc proper entre els dos individus donants, suggeria que podrien compartir algun factor a nivell genètic que induís la disminució de la resposta en presència d'ISO 100 nM. Per aquest motiu vàrem descartar les variants que compartien amb els altres tres individus portadors de la mutació i vàrem centrar l'anàlisi en les variants que compartien aquests dos individus. A la Taula 38 es mostren les variants comunes trobades.

## Resultats

**Taula 38. Variants comunes entre l'individu CPVT-52 i l'individu CPVT-53. "B" indica que la variant és benigne.**

Gen	Tipus de Variant	Variant de nucleòtid	Variant de aminoàcid	Freqüència (%)	Classificació
<i>CACNA1H</i>	Canvi de sentit	c.T1991C	p.V664A	29.75	B
<i>CACNB2</i>	Canvi de sentit	c.T1965G	p.D655E	17.81	B
<i>NEBL</i>	Canvi de sentit	c.G604A	p.G202R	0.26	B
<i>SCN10A</i>	Canvi de sentit	c.C3133A	p.P1045T	2.35	B
<i>XIRP1</i>	Canvi de sentit	c.C4823T	p.A1608V	19.09	B
<i>AKAP9</i>	Canvi de sentit	c.A7451G	p.K2484R	14.67	B
<i>PITX2</i>	Canvi de sentit	c.C607T	p.R203C	34.08	B
<i>PITX2</i>	Codó STOP prematur	c.C577T	p.Q193*	17.96	B
<i>DPP6</i>	Canvi de sentit	c.C914T	p.T305I	0.55	B
<i>XIRP2</i>	Canvi de sentit	c.A1603G	p.R535G	10.25	B
<i>TP63</i>	Codó inici prematur	c.A-58T		69.51	B

Es van identificar variants en gens codificants per canals iònics (*CACNA1H* i *SCN10A*), proteïnes reguladores de canals iònics (*CACNB2* i *DPP6*), proteïnes amb funcions estructurals (*NEBL*, *XIRP1*, *XIRP2* i *AKAP9*) i per factor de transcripció (*PITX2*).





## **VII. DISCUSSIÓ**



## Discussió

La CPVT és una canalopatia hereditària caracteritzada per l'aparició de TVB i TVP induïdes per l'alliberació de catecolamines en situacions d'estrès emocional o físic.<sup>30,31,35,36</sup> Aproximadament un 50% dels casos diagnosticats de CPVT s'associen amb mutacions al gen *RYR2*.<sup>34</sup> La caracterització de mutacions associades a CPVT identificades en el gen *RYR2* clàssicament s'ha realitzat utilitzant models d'expressió heteròloga com les HEK-293T o mitjançant l'ús d'animals *knock in*.<sup>61-63,113-117</sup> Aquests models han permès determinar l'efecte de la mutació sobre la funció del RYR2, però no va ser fins al descobriment de les iPSC que es va poder estudiar conjuntament l'efecte de la mutació i com el patrimoni genètic de l'individu modulava el seu fenotip.

En el present estudi s'ha presentat la caracterització de la mutació RYR2\_p.G357S identificada com a causant dels casos de CPVT en una gran família de l'Illa de Gran Canària per Wangüemert i col·laboradors (2015)<sup>1</sup>, utilitzant iPSC-CM d'individus portadors de la mutació en homozigosis i heterozigosis. Gràcies a aquest model, hem pogut determinar que la mutació indueix un guany de funció del RYR2 a nivell basal que no només no es veu augmentat amb l'aplicació d'ISO 100 nM sinó que encara pot disminuir. Els resultats obtinguts a nivell molecular suggereixen que el guany de funció en condicions basals no ve donat per un augment en la quantitat del RYR2 present en els iPSC-CM, sinó que podria ser degut a la desestabilització estructural descrita per Liu i col·laboradors (2017) per aquesta mutació.<sup>180</sup>

A continuació discutirem punt per punt els resultats en relació a les hipòtesis inicials plantejades.

### **1. La maduració dels iPSC-CM permet obtenir un model fisiològicament rellevant per a l'estudi de l'efecte de la mutació RYR2\_p.G357S en els iPSC-CM individu específics**

Gràcies a l'ús de models d'expressió heteròloga i de models animals, s'ha pogut determinar com mutacions trobades al gen *RYR2* associades CPVT afectaven a la funció del RYR2. Tot i així aquests models no permeten explicar com el patrimoni genètic de l'individu pot modular el fenotip de la mutació. El descobriment de les iPSC per Yamanaka i Takahashi (2006), i la posterior aparició de protocols de diferenciació a iPSC-CM, va fer pensar que es podrien complementar les mancances dels altres

## Discussió

models.<sup>128,131–136</sup> Tot i així estudis a nivell estructural i electrofisiològic van mostrar que els iPSC-CM presenten un fenotip estructural i electrofisiològic immadur llunyà al dels cardiomiòcits adults.<sup>138</sup>

S'han realitzat molts intents per augmentar la maduresa dels iPSC-CM i obtenir-los amb característiques més semblants a les dels cardiomiòcits adults.<sup>29,140–147,193</sup> La complexitat i el cost d'algun dels sistemes limita les opcions d'implementació en molts laboratoris. Tot i això, mètodes més simples com l'ús de petites molècules, com la combinació de T3+Dex utilitzada en aquesta tesi, permeten induir un augment de maduresa tot i quedar lluny dels paràmetres d'un cardiomiòcit adult.

En el present treball, el tractament amb T3+Dex va mostrar ser efectiu en la inducció de maduració dels iPSC-CM de l'individu control sa GPG1. Els iPSC-CM no tractats (Figura 31 i Taula 31) mostraven, en presència d'ISO 100 nM, un lleuger augment de l'alliberació  $\text{Ca}^{2+}$  en concentracions submàximes de cafeïna (Basal:  $K_d=2.92\pm 0.32$  mM vs. ISO 100 nM:  $K_d=2.40\pm 0.33$  mM; p-valor=0.0351). En canvi, els iPSC-CM tractats amb T3+Dex (Figura 32 i Taula 31) mostraven un gran augment de la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  alliberada en concentracions de cafeïna submàximes (Basal:  $K_d=3.09\pm 0.25$  mM vs. ISO 100 nM:  $K_d=1.67\pm 0.20$  mM; p-valor=0.0003). Aquests resultats indicaven que el tractament amb T3+Dex augmentava l'inotropisme, donat per un augment de la quantitat de  $\text{Ca}^{2+}$  disponible en el reticle sarcoplasmàtic. Això indicava que el grau de maduresa a nivell funcional era major en els iPSC-CM tractats amb T3+Dex.

Parikh i col·laboradors (2017) van mostrar que el tractament combinat de T3+Dex i la sembra en matrius de matrigel promovia la formació de túbuls T, una major contribució del reticle sarcoplasmàtic en l'aportació de  $\text{Ca}^{2+}$  als transitoris, un guany substancial en acoblament E-C, una major organització del RYR2 i augment de la proximitat dels LTCC-RYR2.<sup>193</sup>

Més recentment, Wang i col·laboradors (2021) van estudiar iPSC-CM tractats amb T3+Dex sembrats a alta densitat sense matriu de matrigel formant una monocapa. En aquestes condicions, van observar una reducció en la durada del potencial d'acció, una major velocitat de conducció i una major velocitat màxima en la fase de despolarització del PAC. També van observar com iPSC-CM aïllats i tractats amb T3+Dex, però sense

## Discussió

matriu de matrigel, mostraven un augment de les corrents  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{Ks}$  i una reducció de la  $I_f$ . Tot i així era necessària la sembra en matrius de matrigel per induir un augment en la  $I_{Na}$ .<sup>152</sup>

A les nostres mans no ha sigut possible aconseguir que els iPSC-CM siguin viables utilitzant les matrius de matrigel. Tot i així, tant els resultats de Wang i col·laboradors (2021) com els nostres mostren que el tractament amb T3+Dex és suficient per induir maduresa a nivell funcional als iPSC-CM.<sup>152</sup>

Ronaldson-Bouchard i col·laboradors (2018) van mostrar que el co-cultiu d'iPSC-CM i fibroblasts en hidrogels de fibrina, i la posterior estimulació electromecànica durant 4 setmanes, induïa un augment de la maduresa dels iPSC-CM. Aquest procés va mostrar la millora en l'organització estructural, presència de túbuls T, patró d'expressió semblant al teixit adult, hipertròfia cel·lular i moltes altres característiques que apropaven aquests petits teixits al teixit cardíac adult.<sup>29</sup> Dins de totes les millores a nivell funcional, aquests investigadors van observar un augment de la resposta inotròpica dels iPSC-CM als estímuls  $\beta$ -adrenèrgics. Aquest fet mostrava com la maduració dels iPSC-CM anava acompanyada d'una millora en la resposta  $\beta$ -adrenèrgica, donant suport als nostres resultats. És a dir que, tant l'ús de tractaments hormonals com mètodes més complexes per promoure la maduració dels iPSC-CM indueixen un augment de la resposta inotròpica quan la via  $\beta$ -adrenèrgica és activada.

### **2. El fenotip donat per la mutació RYR2\_p.G357S altera la funcionalitat dels RYR2, alterant l'homeòstasi del $Ca^{2+}$ intracel·lular únicament quan s'indueix l'activació de la via $\beta$ -adrenèrgica en situacions d'estrès, podent ser modulable pel nombre d'al·lels mutats.**

La descripció dels primers casos de la CPVT l'any 1975 per Reid i col·laboradors (1975)<sup>32</sup>, i la posterior descripció de la CPVT realitzada per Coumel i col·laboradors (1978)<sup>33</sup>, mostraven que l'alliberació de catecolamines era essencial per a la generació de TVB i TVP que podrien derivar a síncope o MSC. El descobriment de mutacions al gen *RYR2* com a causants de la CPVT, va permetre als clínics implementar el diagnòstic genètic com a eina preventiva en casos familiars de CPVT en les quals s'identificava la mutació causant.<sup>40,41</sup> En el cas de la família descrita per Wangüemert i col·laboradors l'any 2015,

## Discussió

el diagnòstic genètic va permetre detectar la mutació *RYR2\_c.G1069A* (*RYR2\_p.G357S*) com a causant dels casos de CPVT i evitar més casos de MSC en aquesta família.<sup>1</sup> El protocol clínic seguit a partir del descobriment de la mutació inclou el seguiment regular dels portadors i el tractament amb  $\beta$ -bloquejants i en els casos més severes la implantació d'un DAI.

Per aquest estudi vam seleccionar portadors simptomàtics de la mutació tant homozigots (CPVT-53 i CPVT-54) com heterozigots (CPVT-51 i CPVT-52) i un portador asimptomàtic al moment d'ingressar al protocol clínic (CPVT-55).

Els nostres experiments inicials amb els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació *RYR2\_p.G357S*, tant en homozigosis com en heterozigosis, es van focalitzar en com la mutació podia afectar a l'acoblament E-C. A nivell basal, no vam observar cap patró que pogués estar associat amb el nombre d'al·lels mutats. Tampoc es va observar un comportament similar per tots els portadors de la mutació *RYR2\_p.G357S* independentment el nombre d'al·lels mutats, sinó que vam poder determinar que el patró era individu específic (Figura 33 i 35 esquerra i Taula S3,S5-S9).

Els experiments realitzats per Wangüemert i col·laboradors (2015) mostraven com el fenotip patogènic de la mutació es desemmascarava quan es mimetitzava l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>1</sup> Per això, vam realitzar experiments amb ISO 100 nM. Els transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp en presència d'ISO 100 nM tampoc van mostrar modificacions associades al nombre d'al·lels mutats. Tot i així va cridar l'atenció que els iPSC-CM de l'individu heterozigot CPVT-52 i l'individu homozigot CPVT-53 mostraven uns temps d'alliberació i recaptació molt inferiors al control sa. En aquest cas, aquesta modificació no podia ser associada al nombre d'al·lels mutats, però mostrarien una major resposta durant l'aplicació de l'ISO 100 nM (Figura 34 i 35 dreta i Taula S4-S9).

Comparant la resposta a nivell basal i en presència de ISO 100 nM, vam observar que només els iPSC-CM dels individus CVPT-53, CPVT-55 i el control sa GPG1 presentaven un augment de l'amplitud del transitori (Taula 32, S3 i S4). Aquests resultats mostraven que tres dels sis individus tenien un augment de l'inotropisme, tot i presentar genotips diferents envers la mutació. La mesura dels nivells d'expressió de gens associats a

## Discussió

l'acoblament E-C (*CANCA1C* i *FKBP1B*) i gens associats a la recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular (*ATP2A2*, *PLN* i *SLC8A1*), indicaven que no hi haurien d'haver diferències a nivell funcional que no estiguessin associades a la mutació RYR2\_p.G357S (Figura 36 i 37). Tots aquests resultats en conjunt van mostrar que l'efecte no era dependent del nombre d'al·lels mutats, sinó que podia estar associat a diferències en la maduració estructural dels iPSC-CM.

La falta d'organització estructural i la manca de túbuls T en els cardiomiòcits immadurs disminueix la contribució del  $\text{Ca}^{2+}$  del reticle sarcoplasmàtic en el CICR. Estudis amb cor sencer i amb miòcits aïllats de rata mostren que sobretot en els primers dies després del naixement pràcticament tot el  $\text{Ca}^{2+}$  necessari perquè es doni la contracció prové a través sarcolemma donat per la corrent dels canals de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipus T (TTCC), els LTCC, altres canals de  $\text{Ca}^{2+}$  resistents a dihidropiridines i del corrent en mode revers del NCX.<sup>194-196</sup> Estudis de cor sencer de rata han mostrat que en nounats la contribució en el total del transitori del reticle sarcoplasmàtic no supera el 15%. En canvi, en individus de tres setmanes després del naixement la contribució del reticle sarcoplasmàtic augmenta fins al 88% del transitori total.<sup>194</sup>

Degut a les diferents respostes observades en els iPSC-CM dels nostres individus, podríem trobar-nos en una situació en què el nivell de maduració estructural dels iPSC-CM fos heterogènia entre línies. Si bé no vam fer estudis ultraestructurals dels iPSC-CM per tal d'avaluar-ho, la morfologia dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp suggereix que la relació entre sarcolemma i reticle sarcoplasmàtic varia en cada cas. Tenint present aquesta possible ineficiència en l'acoblament E-C, vam decidir estudiar de manera directa l'activació dels RYR2 utilitzant l'agonista específic cafeïna.

Els experiments de transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM van mostrar un guany de funció a nivell basal associat a la mutació (durada del 50% del transitori, Figura 38). Tot i així el nombre d'al·lels mutats no va estar associat amb un major guany de funció. Amb l'aplicació d'ISO 100 nM, el guany de funció dels iPSC-CM dels portadors es va mantenir, però no vam detectar diferències respecte al nombre d'al·lels mutats (Figura 39).



## Discussió

L'ús de cafeïna indicava que podíem veure diferències a nivell de funció de RYR2, tot i que només l'aplicació d'una sola dosi no ens donava prou informació de com la mutació podia afectar la funció del RYR2. Per aquest motiu, vam realitzar corbes concentració-resposta de cafeïna. Aquests experiments van mostrar un augment de funció generalitzat a nivell basal en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en homozigosis i heterozigosis respecte al control sa (Figura 41, 43 Esquerra i Taula 34). Aquest fet era coherent amb les observacions realitzades en els transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM en situacions basals.

Els estudis realitzats per Wangüemert i col·laboradors (2015) mostraven com l'addició de forskolina promovia un guany de funció augmentant la sensibilitat a cafeïna de RYR2\_p.G357S i l'activitat SOICR.<sup>1</sup> Liu i col·laboradors (2017), en canvi van mostrar que l'activitat de SOICR podia ser observada ja a nivell basal amb aquesta mutació.<sup>180</sup> Això suggereix que l'aparició del fenotip, segons el model, pot mostrar variacions.

Al nostre model, les corbes concentració-resposta en presència d'ISO 100 nM van mostrar que el guany de funció observat a nivell basal no podia ser augmentat (Figura 42, 43 dreta i Taula 35). Els iPSC-CM dels individus heterozigots CPVT-51 i CPVT-55, i l'individu homozigot, CPVT-54 no van presentar un augment de funció del RYR2 respecte les seves condicions basals. En canvi, els iPSC-CM de l'individu heterozigot CPVT-52 i l'individu homozigot CPVT-53 van presentar una disminució de la funció (Taula 36). Aquesta disminució en la resposta a cafeïna no va ser promoguda per una disminució de  $Ca^{2+}$  en el reticle sarcoplasmàtic, ja que per aquests dos individus la quantitat de  $Ca^{2+}$  alliberada per un pols de 10 mM de cafeïna en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM era la mateixa (Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ ) Figura 38 i 39). Als estudis moleculars, no es van detectar diferències en l'expressió dels gens associats a resposta  $\beta$ -adrenèrgica, suggerint que l'activitat d'aquesta via es manté sense canvis (Figura 44 i 45).

Estudis realitzats amb les mutacions RYR2\_p.R176Q, RYR2\_p.S406L i RYR\_p.R420Q localitzades a la regió N-terminal del RYR2 en models d'iPSC-CM, mostren que el fenotip maligna de la mutació és observable quan es promou l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>161-164</sup> Aquest fets corroboren les observacions fetes amb models animals per les mutacions RYR2\_p.R420W, RYR2\_p.A4860G<sup>+/-</sup> i RYR2\_p.R4496C<sup>+/-</sup> en els quals les

## Discussió

situacions d'estrès desencadenen TVB i TVP.<sup>62,64,197</sup> En canvi, amb la mutació RYR2\_p.H29D el fenotip maligne s'observa en condicions basals. Aquesta mutació va ser identificada en un individu que presentava TVP en repòs. Estudis de canal únic van mostrar que la mutació RYR2\_p.H29D augmentava la  $P_o$  i la freqüència d'obertura en resposta a concentracions baixes de  $Ca^{2+}$  a la cara citosòlica del canal sense ser fosforilat. Aquests experiments suggerien que la mutació RYR2\_p.H29D podria generar una major freqüència de *sparks* de  $Ca^{2+}$  que acabessin generant TVP als individus portadors en estat basal.<sup>116</sup> Estudis realitzats amb iPSC-CM van mostrar que la mutació RYR2\_p.H29D presentava un guany de funció en condicions basals. Els iPSC-CM amb el canal RYR2\_p.H29D tenien un augment de les sortides espontànies de  $Ca^{2+}$  i una major velocitat d'alliberació en condicions basals que el control isogènic corregit per CRISPR/Cas9. L'aplicació d'ISO 1  $\mu$ M no va augmentar el guany de funció observat en condicions basals, mostrant que la mutació RYR\_p.H29D induïa un augment de funció dels RYR2 sense necessitat de l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica.<sup>160</sup> Els nostres resultats mostren que els individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55 tenen el mateix comportament que l'observat per la mutació RYR2\_p.H29D.

A nivell clínic l'individu CPVT-51 va patir un presíncope a 19 anys motiu pel qual se li va implantar un DAI, que el va recuperar d'una MSC a 21 anys, i se'l va tractar amb metoprolol. L'individu CPVT-55, és la germana de l'individu anterior, a nivell clínic no se li coneixien símptomes. L'individu CPVT-54 no té cap parentesc directe amb els altres, però aquest ja havia presentat diversos episodis de síncope, el primer a 8 anys. Per aquest motiu, se li va implantar un DAI i se'l va tractar farmacològicament amb propranolol. Tant els anàlisis funcionals realitzats amb els iPSC-CM com la simptomatologia de l'individu heterozigot CPVT-51 i l'individu homozigot CPVT-54, mostren que el nombre d'al·lels mutats no té un paper clau en la penetrància d'aquesta mutació. Les corbes concentració-resposta mostren que els RYR2 dels individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55 presenten un guany de funció, similar tant en condicions basals com en presència d'ISO 100 nM. Aquest fet permet especular sobre l'estequiometria necessària de la mutació RYR2\_p.G357S dins el tetràmer per tal d'induir la modificació de la funció del canal. Estudis realitzats per Wilson i col·laboradors (2021) en animals *knock in* per la mutació en RYR2\_V2475F<sup>+/-</sup> mostren que, si ambdós al·lels s'expressen

## Discussió

de forma similar, únicament els canals que estan formats per dues o més subunitats mutades veuen afectada la seva funció. Mostrant que aproximadament un 70% dels canals presenten un guany de funció.<sup>198</sup> Suposant que tant l'al·lel portador de la mutació RYR2\_p.G357S com el WT s'expressin al mateix nivell, ens podríem trobar en una situació semblant, en la qual canals amb dos o més monòmers mutats (68.5% de totes les combinacions) produirien l'augment de funció els iPSC-CM dels nostres individus heterozigots. Aquest guany de funció seria quantitativament semblant al dels individus homozigots. Una altra possibilitat és que només un monòmer sigui suficient per produir l'efecte.

A nivell clínic, els individus CPVT-52 (heterozigot) i CPVT-53 (homozigot) han mostrat simptomatologies diferents. L'individu CPVT-52 va experimentar un síncope en situació de repòs a 39 anys i se li va implantar un DAI. En canvi, l'individu CPVT-53 va patir un síncope a 8 anys i també se li va implantar un DAI i es va iniciar el tractament amb nadolol. Els iPSC-CM d'aquests dos individus mostren també un guany de funció en condicions basals. Això concordaria amb l'hipòtesi que hem plantejat de la formació dels tetràmers de RYR2 segons l'estudi de Wilson i col·laboradors (2021).<sup>198</sup> No obstant això, el guany de funció disminuïa en presència d'ISO 100 nM, la qual cosa diferia molt del que està descrit per mutacions del RYR2 fins al moment. Aquests individus tenen un parentesc de segon grau, ja que són primera (CPVT-52) i tercera generació (CPVT-53) del mateix nucli familiar. La línia CPVT-53, presenta la mutació amb homozigosis i a nivell basal mostrava un guany de funció superior a les dels altres individus, però en presència de l'estímul  $\beta$ -adrenèrgic la funció dels RYR2 va disminuir fins als nivells de les altres línies (CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55). L'individu CPVT-52, mostrava a nivell basal un guany de funció similar als individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55, però durant l'aplicació d'ISO 100 nM la funció va disminuir fins a nivells propers a l'estat basal dels iPSC-CM de l'individu control sa. Aquests fets suggereixen, per una banda que el comportament a nivell basal és equiparable a l'observat en la mutació RYR2\_p.H29D i, per l'altra, que la composició dels tetràmers de RYR2 podria ser semblant a la descrita per Wilson i col·laboradors (2021).<sup>160,198</sup>

Com s'ha mencionat, els iPSC-CM dels individus, CPVT-52 i CPVT-53 van presentar una disminució de la funció en presència d'ISO 100 nM. Al formar part del mateix llinatge

## Discussió

familiar (1<sup>a</sup> i 3<sup>a</sup> generació, respectivament), aquests dos individus podrien compartir algun factor protector que expliqués la reversió en el guany de funció observada.

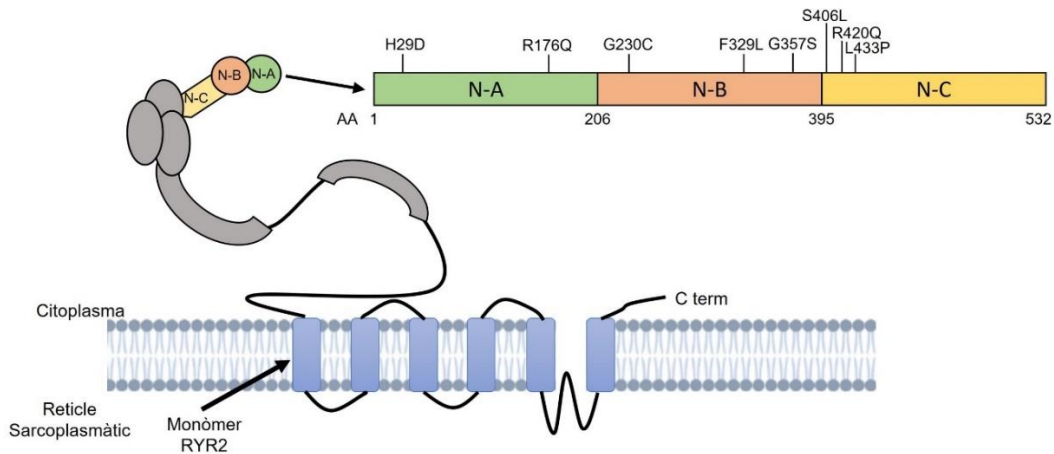
### **3. El guany de funció al RYR2 causat per la mutació RYR2\_p.G357S es veu mitigat per la reducció de la quantitat de proteïna present en els iPSC-CM**

La mutació RYR2\_p.G357S es localitza en el subdomini B del domini N-terminal del RYR2. Aquesta regió és essencial per a la regulació de la finalització de l'alliberació de Ca<sup>2+</sup>, per això mutacions en aquesta regió poden augmentar l'activació de RYR2 per la desestabilització de les interaccions entre el subdomini A i B.<sup>75</sup> Per altra banda, Liu i col·laboradors (2017) van mostrar mitjançant experiments de western blot i d'unió de rianodina [<sup>3</sup>H] com en un model d'expressió heteròloga la mutació RYR2\_p.G357S reduïa la quantitat de RYR2. Experiments d'estabilitat tèrmica realitzats únicament amb la regió que comprèn els subdominis A, B i C van mostrar que la mutació RYR2\_p.G357S, localitzada en un bucle que connecta dos fulls β, induïa la desestabilització d'aquests subdominis fet que podria explicar la reducció de la quantitat de proteïna expressada.<sup>180</sup>

Els nostres experiments amb els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S no van mostrar diferències ni en els nivells d'RNA ni en els de proteïna respecte l'individu control sa. Això suggereix que la mutació RYR2\_p.G357S no indueix la degradació de la proteïna en condicions natives.

L'estabilitat de RYR2 amb altres mutacions localitzades en el domini N-terminal ha estat analitzada utilitzant models animals, models d'expressió heteròloga i iPSC-CM (Figura 48).

## Discussió



**Figura 48. Localització de les mutacions en el domini N-terminal de les quals s'ha estudiat l'efecte en l'estabilitat de la proteïna.** Es mostra la linealització del domini N-terminal d'un monòmer de RYR2, la separació en els seus subdominis (N-A, N-B i N-C) i la posició de cada una de les mutacions de les quals s'ha avaluat la implicació en la degradació de RYR2.

Utilitzant un model de ratolí *knock in* es va determinar que la mutació RYR2\_p.R176Q, localitzada en el subdomini A, no afectava en el nivell d'expressió del gen *RYR2* ni en la quantitat de proteïna.<sup>199</sup> Mitjançant un model d'expressió heteròloga es va estudiar la mutació RYR2\_p.G230C, localitzada en el subdomini B en un motiu conservat glicina-glicina proper a la unió dels subdominis A i B. L'estudi d'estabilitat tèrmica del domini N-terminal va mostrar que la mutació induïa la desestabilització del domini, però sense modificar la quantitat de proteïna.<sup>118</sup> Una altra mutació localitzada en el subdomini B és la RYR2\_p.F329L, que es troba en una regió molt hidrofòbica en el subdomini B i introdueix una cadena lateral hidrofòbica més petita que podria reduir l'empaquetament de la regió. Mitjançant experiments de cromatografia es va poder observar com expressant únicament el domini N-terminal, aquest es degradava.<sup>200</sup>

La mutació RYR2\_p.L433P s'ha vist que causa una disminució de la hidrofobicitat del domini, causant un trencament en les  $\alpha$ -hèlix i la desestabilització de subdomini C. En experiments de cromatografia, amb únicament el domini N-terminal, es va observar que la mutació RYR2\_p.L433P causava la degradació del domini.<sup>200</sup> Tot i això, experiments d'expressió heteròloga amb HEK-293T no van mostrar diferències en la quantitat de proteïna.<sup>113</sup> Aquests experiments mostren que la inestabilitat del domini N-terminal aïllat no implica un efecte en l'estabilitat de la proteïna sencera.

## Discussió

Estudis en models d'iPSC-CM per mutacions localitzades al subdomini A com la RYR2\_p.H29D i les localitzades al subdomini C com les RYR2\_p.S406L i RYR2\_p.R420Q, van mostrar que cap d'aquestes mutacions induïa canvis dels nivells de proteïna del RYR2.<sup>160,162,164</sup>

Tots aquests indicis concorden amb els nostres resultats, on la quantitat de proteïna i d'RNA del RYR2 no es veuen afectats per la mutació RYR2\_p.G357S al contrari del que suggerien Liu i col·laboradors (2017) amb un model d'expressió heteròloga.<sup>180</sup> No obstant això, la inestabilitat tèrmica dels subdominis ABC del domini N-terminal, mostrada pels mateixos autors, podria explicar el guany de funció observat en els iPSC-CM portadors de la mutació RYR2\_p.G357S.

#### **4. El patrimoni genètic dels individus modula la severitat del fenotip de la mutació RYR2\_p.G357S**

Les canalopaties mostren expressivitat variable i penetrància incompleta. Aquest fet ha estat associat al patrimoni genètic dels individus, el qual pot modular l'expressió i severitat del fenotip en els individus.<sup>54,59</sup> Entre els individus que formen part del nostre estudi, tenim dos clars casos en què el patrimoni genètic juga un paper modulador en l'expressió del fenotip.

El primer és el cas dels individus CPVT-51 i CPVT-55, els quals són dos germans heterozigots. La diferència a nivell clínic entre aquests individus és que l'individu CPVT-51 va patir un episodi de síncope a 19 anys i una MSC recuperada a 21 anys i, en canvi, la germana CPVT-55 no ha mostrat cap simptomatologia. En els experiments de transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM (Figura 38, 39 i 40 ; Taula S10-12) els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 van mostrar una durada del 50% del transitori major, fet que mostrava que el canal era més actiu que en els iPSC-CM de la seva germana en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM (Basal: CPVT-51=932.72±14.50ms vs. CPVT-55=811.19±8.67, p-valor=1.84E-17 ; ISO 100 nM: CPVT-51=888.97±13.37ms vs. CPVT-55=746.82±8.34ms, p-valor=2.64E-12). En canvi, la funció global del canal mesurada en les corbes concentració-resposta era semblant entre els dos individus en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM no es modificava la funció (Basal: CPVT-51=1.77±0.30 mM vs. CPVT-55=1.45±0.20 mM p-valor=0.4241 ; ISO 100 nM: CPVT-

## Discussió

51=1.86±0.14 mM vs. CPVT-55=1.83±0.31 mM, p-valor=0.8850). Aquests fets suggerien que diferències en el patrimoni genètic dels germans serien les causants que l'individu CPVT-51 fos més susceptible a patir arrítmies malignes. Dins el genoma d'aquest individu vàrem poder determinar la presència de quatre variants úniques de les quals dos tenien una freqüència poblacional molt baixa (Taula 37). Aquestes van ser la variant *SCN11A\_c.A5366G* (*Nav1.9\_p.H1789R*) i *TTN\_c.G51662A* (*TTN\_p.R17221H*). A la literatura no vàrem trobar estudis funcionals, per aquestes mutacions les vàrem classificar com a VSI.

El gen *SCN11A* codifica pel canal de sodi depenent de voltatge *Nav1.9*, aquest canal es troba localitzat en el sistema nerviós perifèric principalment en neurones primàries sensibles de nocicepció en els ganglis de l'arrel dorsal i trigeminals i en les cèl·lules AH del plexe mientèric a l'intestí. Fins al moment, només s'han identificat mutacions al *Nav1.9* que generen un guany de funció i estan associades a episodis de dolor, dolor neuropàtic i en alguns casos insensibilitat al dolor.<sup>201</sup> Altres autors també han associat aquest gen amb altres patologies. Coll i col·laboradors (2016) van estudiar una cohort de pacients amb epilèpsia que havien patit mort sobtada (SUDEP). En aquest estudi van identificar una variant rara en el gen *SCN11A* que podria tenir un rol patogènic en la SUDEP.<sup>202</sup>

A nivell fisiològic hi ha altres mecanismes regulats pel sistema nerviós perifèric que impliquen la correcta funció del canal *Nav1.9*. Els estímuls mecànics i químics originats en els músculs durant l'exercici incrementen l'activitat del canal *Nav1.9* localitzat a les neurones aferents del grup III i IV del sistema nerviós simpàtic. L'augment d'activitat d'aquestes vies iniciarà el reflex pressor de l'exercici (RPE), que augmentarà la pressió sanguínia i la freqüència cardíaca. S'ha vist que aquesta resposta és exagerada en individus amb hipertensió, malaltia vascular perifèrica i en pacients amb insuficiència cardíaca. Un RPE exagerat en individus amb aquestes patologies està associat a un augment del risc d'infart de miocardi.<sup>203</sup> Aquestes observacions suggereixen que mutacions en el canal *Nav1.9* que poguessin alterar el RPE podrien alterar el ritme cardíac i augmentar el risc d'arrítmies.

## Discussió

L'altra mutació identificada en aquest mateix individu és la TTN\_p.R17221H. El gen *TTN* codifica per la proteïna anomenada titina, que serveix com connexió entre el disc Z i la línia M dels sarcòmers. A més de la funció purament estructural, la titina és important per la formació del sarcòmer, sensibilitat mecànica i transducció del senyal.<sup>204</sup> El 20-25% dels casos de cardiomiopatia dilatada s'han associat a mutacions al gen *TTN*, sent majoritàriament canvis nucleotídics que generen truncaments en la proteïna i que principalment desorganitzen el sarcòmer.<sup>6,204</sup> Hinson i col·laboradors (2015) van realitzar estudis amb iPSC-CM d'individus amb truncaments i una mutació de canvi de sentit en el gen *TTN*. Van mostrar com la mutació de canvi de sentit TTN\_p.W976R causava la reducció d'un 50% en la força de contracció. Mostrant com mutacions de canvi de sentit també poden tenir un rol patogènic en la cardiomiopatia dilatada i no únicament els truncaments.<sup>205</sup> La mutació de canvi de sentit trobada en l'individu CPVT-51 es troba a la banda A a diferència de la mutació descrita per Hinson i col·laboradors (2015) que es troba a la banda I.<sup>205</sup> La banda A de la titina es creu que actua com a motlle en la miofibrilogenesis regulant l'assemblatge de filaments gruixuts de miosina.<sup>206</sup> Truncaments en aquesta regió, com els observats per Hinson i col·laboradors (2015), produeixen la desorganització i redueixen la longitud dels sarcòmers. Això provoca la disminució de la força de contracció causant una resposta alterada a l'estrès mecànic i a la resposta  $\beta$ -adrenèrgica dels iPSC-CM.<sup>205</sup> Schick i col·laboradors (2018) mostren com truncaments en la banda A de la titina alteren la formació i l'estabilitat dels sarcòmers. A nivell funcional aquests investigadors van determinar que el truncament en la titina alterava l'amplitud de la contracció sense efectes en l'amplitud del transitori de  $\text{Ca}^{2+}$  induït per estimulació elèctrica. Aquests van mostrar que els defectes causats pels truncaments en la titina afecten al mecanisme de contracció i el de recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, però no alteren el mecanisme d'alliberació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular tot i la reducció de l'expressió de RYR2.<sup>207</sup> Semblant als resultats de Hinson i col·laboradors (2015), Schick i col·laboradors (2018) van determinar que la resposta  $\beta$ -adrenèrgica també es veia alterada.<sup>205,207</sup>

Tot i les evidències presentades per Hinson i col·laboradors (2015) mutacions de canvi de sentit poden tenir també un paper modulador.<sup>205</sup> Akinrinade i col·laboradors (2019) van estudiar una cohort de pacients afectats amb cardiomiopatia dilatada. Aquests van



## Discussió

mostrar que un 69% de les mutacions de canvi de sentit classificades com a deletèries identificades en la TTN es localitzaven a la regió de la banda A. Tot i així, aquests investigadors determinen que variants de canvi de sentit de freqüència baixa en el gen *TTN* podrien tenir un paper modulador de la severitat de la malaltia.<sup>208</sup>

S'ha mostrat que tant el canal  $\text{Na}_v1.9$  com la titina juguen un paper fonamental en la regulació de la freqüència del batec i en la contracció cardíaca. Mutacions en els gens codificants per aquestes dues proteïnes, com les identificades en l'individu CPVT-51, podrien alterar el funcionament normal del cor. Els defectes en la contracció que podria induir la mutació *TTN\_p.R17221H* conjuntament amb la modificació del reflex RPE en situacions d'estrès físic induït per la mutació  $\text{Na}_v1.9\_p.H1789R$  i el guany de funció de RYR2 induït per la mutació *RYR2\_p.G357S* podrien formar en conjunt un substrat arritmogènic suficient per explicar per què aquest individu va patir una MSC i, en canvi, la seva germana, l'individu CPVT-55, és asimptomàtica.

A nivell clínic l'individu heterozigot CPVT-52 va tenir un síncope a 39 anys, mentre que l'individu CPVT-53 el va tenir a 8 anys. A nivell del nostre model experimental, els transitori de  $\text{Ca}^{2+}$  amb cafeïna 10 mM (Figura 38, 40 i Taules S10 i S12) van mostrar una durada major en els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 que en l'individu CPVT-53 (CPVT-52=819.03±10.18ms vs. CPVT-53=752.54±8.59ms, p-valor=0.0005), suggerint que RYR2 es trobava més temps obert durant el transitori de  $\text{Ca}^{2+}$ . Tot i això, l'aplicació d'ISO 100 mM (Figura 39-40 i Taula S11-12) va igualar la funció en els iPSC-CM d'ambdós individus (CPVT-52=758.60±13.54ms vs. CPVT-53=792.97±8.66ms, p-valor=0.2477). En canvi, les corbes concentració-resposta a nivell basal (Figura 41 i 43, Taula 34) van mostrar que la sensibilitat a cafeïna era superior als iPSC-CM de l'individu CPVT-53 (CPVT-52=1.97±0.15 mM vs. CPVT-53=1.06±0.13 mM, p-valor=0.016). Però, l'aplicació d'ISO 100 nM (Figura 42 i 43, Taula 36) va promoure la disminució de la sensibilitat a cafeïna respecte les seves condicions basals en els iPSC-CM d'ambdós individus (Basal: CPVT-52=1.97±0.15 mM vs. ISO 100 nM=2.54±0.12 mM, p-valor=0.0180; CPVT-53: Basal= 1.06±0.13 mM vs. ISO 100 nM=1.84±0.07 mM, p-valor=2.23E-04).

L'alliberació de catecolamines en situacions d'estrès indueix l'activació de la via  $\beta$ -adrenèrgica en els cardiomiòcits, causant la fosforilació de RYR2 i l'augment de la seva

## Discussió

funció.<sup>10,22</sup> No obstant això, els iPSC-CM dels individus CPVT-52 i CPVT-53 han mostrat la resposta contrària, és a dir, una disminució de l'activitat dels RYR2 en presència d'ISO 100 nM respecte les condicions basals. El grau de parentesc d'aquests dos individus podria estar indicant que comparteixen alguna variant que podria estar modulant la resposta a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica. L'alta freqüència poblacional de les variants compartides per aquests dos individus i la seva classificació com a variant benignes (Taula 38) suggereix que cap de les variants trobades pot tenir un paper en una resposta fisiològica anòmala.

### 5. Discussió global dels resultats obtinguts

El nostre estudi dona suport a què la mutació RYR2\_p.G357S indueix un guany de funció tal com varen mostrar Wangüemert i col·laboradors (2015)<sup>1</sup> i Liu i col·laboradors (2017).<sup>180</sup> El mecanisme estructural del guany de funció de la mutació RYR2\_p.G357S proposat per Liu i col·laboradors (2017) es basa en que el canvi RYR2\_p.G357S interferiria en el plegament correcte del domini N-terminal i simultàniament provocaria una reducció en la quantitat de proteïna.<sup>180</sup> Tot i que, en els iPSC-CM dels portadors hem observat un guany de funció, no es va observar una reducció de la quantitat de proteïna de RYR2. Aquesta diferència podria donar-se per l'ús de diferents models com els natus (iPSC-CM) o d'expressió heteròloga (HEK-293T). Tot i que, els nostres experiments no donen informació sobre l'estabilitat estructural de RYR2, la semblança en la quantitat d'aquesta proteïna en els iPSC-CM dels individus portadors i el control sa no dona suport a l'hipòtesi de la inestabilitat del domini N-terminal plantejada per Liu i col·laboradors (2017).<sup>180</sup>

Comparant la simptomatologia dels nostres individus amb els resultats obtinguts amb els iPSC-CM podem afirmar que el guany de funció a nivell basal i insensible a ISO 100 nM observat en els iPSC-CM dels individus CPVT-51, CPVT-54 i CPVT-55 pot generar el substrat necessari per a la generació d'arrítmies malignes en situacions d'estrès. Aquest fet explicaria els casos de síncope i MSC en situacions d'estrès als individus CPVT-51 i CPVT-54. En canvi, per l'individu CPVT-55 no podem relacionar el guany de funció amb simptomatologia, ja que no es té registrat que patís cap episodi abans de l'inici del tractament. La diferència de fenotip clínic de l'individu CPVT-51 respecte la seva germana, l'individu CPVT-55, potser està relacionat amb la presència de les mutacions

## Discussió

Nav1.9\_p.H1789R i TTN\_p.R17221H que, juntament amb la mutació RYR2\_p.G357S, formarien un substrat més arritmogènic en aquest individu.

Vàrem observar que els iPSC-CM de l'individu homozigot CPVT-53 presentaven amb més severitat el substrat proarrítmic, fet que es podria associar amb el síncope a 8 anys. Tot i això, la presència d'ISO 100 nM redueix el guany de funció a nivells semblants als iPSC-CM dels individus anteriors. Finalment, els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren també que el substrat proarrítmic és disminuït a nivells inferiors als iPSC-CM dels altres individus. És a dir, que tot i tenir el substrat proarrítmic, la simptomatologia hauria de ser més lleu. Això podria explicar la història clínica de l'individu que registra un síncope a 39 anys, edat tardana comparat amb la mitja d'inici dels símptomes en la CPVT.

Wangüemert i col·laboradors (2015) van mostrar que tant l'expressivitat com la penetrància de la mutació RYR2\_p.G357S és relativament baixa en aquesta gran família.<sup>1</sup> Liu i col·laboradors (2017) justifiquen la baixa penetrància i expressivitat mostrant com en el seu model la mutació desestabilitza els RYR2 induint-ne la degradació.<sup>180</sup> Els nostres experiments de qPCR i western blot mostren que tant l'expressió com la quantitat de RYR2 no varien entre línies. Les corbes concentració-resposta de cafeïna mostren indicis que els familiars CPVT-52 i CPVT-53 compartien algun factor genètic que els donaria una resposta diferent als altres individus en situacions d'estrès. Aquest fet dona suport a la variabilitat fenotípica observada en els portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, però no permet establir associacions més robustes.

Per completar els estudis realitzats en aquesta tesi doctoral creiem que seria interessant implementar l'edició genètica mitjançant CRISPR/Cas9 per tal d'obtenir línies isogèniques d'iPSC-CM amb i sense la mutació RYR2\_p.G357S. Això permetria relacionar el context cel·lular donat pel patrimoni genètic de l'individu amb l'efecte de desestabilització del domini N-terminal donat per la mutació RYR2\_p.G357S. Una altra aproximació que ens donaria més informació de l'efecte de la mutació seria generar un animal *knock in*. Estudis realitzats per Willis i col·laboradors (2021) van mostrar que les cèl·lules de Purkinje tenien un llindar inferior per a la generació de DADs i EADs.<sup>65</sup> Per tant, seria interessant determinar com la mutació afecta tant als cardiomiòcits adults com al sistema de conducció.

## **VIII. CONCLUSIONS**



## Conclusions

1. El tractament amb T3+Dex entre els dies 16-30 postinici de diferenciació introdueix millores a la resposta  $\beta$ -adrenèrgica en els iPSC-CM associades a l'augment de la maduresa funcional.
2. Els experiments amb estimulació elèctrica de camp no van permetre establir una associació entre els paràmetres dels transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts i el nombre d'al·lels mutats. L'augment de maduresa aconseguit en els iPSC-CM probablement no és suficient per establir diferències en l'acoblament E-C.
3. Els transitoris de  $\text{Ca}^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM, tant en condicions basals com en presència d'ISO 100 nM, mostren un augment en la durada del transitori en els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Aquest augment en la durada del transitori és indicatiu d'un guany de funció del canal mutat.
4. Les corbes concentració-resposta de cafeïna en condicions basals mostren un augment de sensibilitat a aquest agonista en els iPSC-CM dels portadors de la mutació RYR2\_p.G357S, respecte als iPSC-CM del control sa. Aquest augment de la sensibilitat és també indicatiu d'un guany de funció del canal mutat.
5. En presència d'ISO 100 nM, la sensibilitat a cafeïna dels iPSC-CM del control sa es veu augmentada respecte la condició basal. Els iPSC-CM RYR2\_p.G357S, en canvi, no mostren augment de la sensibilitat a cafeïna o és disminuïda. Aquesta resposta anòmala de la via  $\beta$ -adrenèrgica explica en part el substrat arrítmic dels individus.
6. El guany de funció induït per la mutació RYR2\_p.G357S no ve causat per un augment en la quantitat de proteïna.
7. Els estudis moleculars no mostren diferències en els nivells d'expressió dels gens involucrats en l'acoblament E-C, recaptació del  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular i de resposta a l'estímul  $\beta$ -adrenèrgic entre els iPSC-CM de l'individu control sa i dels portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Aquests resultats suggereixen que els gens estudiats no contribuirien en el guany de funció del canal RYR2\_p.G357S.
8. Les mutacions Nav1.9\_p.H1789R i TTN\_p.R17221H trobades a l'individu CPVT-51 podrien explicar la diferència en l'expressivitat del fenotip respecte al seu familiar CPVT-55.

## Conclusions

9. La disminució de funció de RYR2\_p.G357S en presència d'ISO 100 nM observada en els individus CPVT-52 i CPVT-53 no pot ser explicada per les variants genètiques compartides entre aquests dos familiars.
10. Tots els resultats en conjunt suggereixen que el guany de funció causat per la mutació RYR2\_p.G357S en condicions basals i la seva resposta anòmala a l'estimulació  $\beta$ -adrenèrgica es el substrat arritmogènic necessari per què és formin les arrítmies malignes. La baixa penetrància i expressivitat de la mutació en la gran família de les Illes Canàries no és donada per la degradació del RYR2. Sinó que variants individuals, com les trobades en aquest estudi, podrien augmentar o disminuir la severitat del fenotip dels individus portadors de la mutació.

## **IX. BIBLIOGRAFIA**





## Bibliografia

1. Wangüemert F, Bosch Calero C, Pérez C, et al. Clinical and molecular characterization of a cardiac ryanodine receptor founder mutation causing catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Heart Rhythm*. 2015;12(7):1636-1643. doi:10.1016/J.HRTHM.2015.03.033
2. Markwerth P, Bajanowski T, Tzimas I, Dettmeyer R. Sudden cardiac death—update. *Int J Legal Med*. 2021;135(2):483-495. doi:10.1007/S00414-020-02481-Z
3. Kumar A, Avishay DM, Jones CR, et al. Sudden cardiac death: Epidemiology, pathogenesis and management. *Rev Cardiovasc Med*. 2021;22(1):147-158. doi:10.31083/J.RCM.2021.01.207
4. Teodorovich N, Mikhaylov EN, Mitrofanova LB, Swissa M. Sudden cardiac death, not what you thought. *Cardiology*. 2022;147(3):335-336. doi:10.1159/000524314
5. Fernández-Falgueras A, Sarquella-Brugada G, Brugada J, Brugada R, Campuzano O. Cardiac Channelopathies and Sudden Death: Recent Clinical and Genetic Advances. *Biology (Basel)*. 2017;6(1):7. doi:10.3390/BIOLOGY6010007
6. Vogiatzi G, Lazaros G, Oikonomou E, Lazarou E, Vavuranakis E, Tousoulis D. Role of genetic testing in cardiomyopathies: A primer for cardiologists. *World J Cardiol*. 2022;14(1):29-39. doi:10.4330/WJC.V14.I1.29
7. Kim JB. Channelopathies. *Korean J Pediatr*. 2014;57(1):1-18. doi:10.3345/KJP.2014.57.1.1
8. Cerrone M, Priori SG. Genetics of sudden death: focus on inherited channelopathies. *Eur Heart J*. 2011;32(17):2109-2120. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHR082
9. Amin AS, Tan HL, Wilde AAM. Cardiac ion channels in health and disease. *Heart Rhythm*. 2010;7(1):117-126. doi:10.1016/J.HRTHM.2009.08.005
10. Bers DM. Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature*. 2002;415(6868):198-205. doi:10.1038/415198A

## Bibliografia

11. Eisner DA, Caldwell JL, Kistamás K, Trafford AW. Calcium and Excitation-Contraction Coupling in the Heart. *Circ Res.* 2017;121(2):181-195. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.310230
12. Franzini-Armstrong C, Protasi F, Ramesh V. Shape, size, and distribution of Ca(2+) release units and couplons in skeletal and cardiac muscles. *Biophys J.* 1999;77(3):1528-1539. doi:10.1016/S0006-3495(99)77000-1
13. Kranias EG, Hajjar RJ. Modulation of Cardiac Contractility by the Phospholamban/SERCA2a Regulator. *Circ Res.* 2012;110(12):1646-1660. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.259754
14. Graves JP, Primeau JO, Espinoza-Fonseca LM, Lemieux MJ, Young HS. The Phospholamban Pentamer Alters Function of the Sarcoplasmic Reticulum Calcium Pump SERCA. *Biophys J.* 2019;116(4):633-647. doi:10.1016/J.BPJ.2019.01.013
15. Larbig R, Torres N, Bridge JHB, Goldhaber JI, Philipson KD. Activation of reverse Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange by the Na<sup>+</sup> current augments the cardiac Ca<sup>2+</sup> transient: evidence from NCX knockout mice. *J Physiol.* 2010;588(17):3267-3276. doi:10.1113/JPHYSIOL.2010.187708
16. Aronsen JM, Swift F, Sejersted OM. Cardiac sodium transport and excitation-contraction coupling. *J Mol Cell Cardiol.* 2013;61:11-19. doi:10.1016/J.YJMCC.2013.06.003
17. Shattock MJ, Ottolia M, Bers DM, et al. Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange and Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase in the heart. *J Physiol.* 2015;593(Pt 6):1361-1382. doi:10.1113/JPHYSIOL.2014.282319
18. Cannell MB, Kong CHT. Quenching the spark: Termination of CICR in the submicroscopic space of the dyad. *J Gen Physiol.* 2017;149(9):837-845. doi:10.1085/JGP.201711807
19. Waddell HMM, Zhang JZ, Hoeksema KJ, McLachlan JJ, McLay JC, Jones PP. Oxidation of RyR2 Has a Biphasic Effect on the Threshold for Store Overload-Induced Calcium Release. *Biophys J.* 2016;110(11):2386-2396. doi:10.1016/J.BPJ.2016.04.036

## Bibliografia

20. MacLennan DH, Chen SRW. Store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release as a triggering mechanism for CPVT and MH episodes caused by mutations in RYR and CASQ genes. *J Physiol*. 2009;587(Pt 13):3113-3115. doi:10.1113/JPHYSIOL.2009.172155
21. Woo AYH, Xiao RP.  $\beta$ -Adrenergic receptor subtype signaling in heart: From bench to bedside. *Acta Pharmacologica Sinica* 2012 33:3. 2012;33(3):335-341. doi:10.1038/aps.2011.201
22. Castellano M, Böhm M. The Cardiac  $\beta$ -Adrenoceptor–Mediated Signaling Pathway and Its Alterations in Hypertensive Heart Disease. *Hypertension*. 1997;29(3):715-722. doi:10.1161/01.HYP.29.3.715
23. DiFrancesco D, Camm JA. Heart Rate Lowering by Specific and Selective I<sub>f</sub> Current Inhibition with Ivabradine. *Drugs* 2004 64:16. 2012;64(16):1757-1765. doi:10.2165/00003495-200464160-00003
24. Monfredi O, Maltsev VA, Lakatta EG. Modern concepts concerning the origin of the heartbeat. *Physiology (Bethesda)*. 2013;28(2):74-92. doi:10.1152/PHYSIOL.00054.2012
25. Sampson KJ, Kass RS. The molecular mechanisms of adrenergic stimulation in the heart. *Heart rhythm: the official journal of the Heart Rhythm Society*. 2010;7(8):1151-1153. doi:10.1016/J.HRTHM.2010.02.013
26. Freestone NS, Ribaric S, Scheuermann M, Mauser U, Paul M, Vetter R. Differential lusitropic responsiveness to  $\beta$ -adrenergic stimulation in rat atrial and ventricular cardiac myocytes. *Pflügers Archiv* 2000 441:1. 2000;441(1):78-87. doi:10.1007/S004240000397
27. Pillekamp F, Haustein M, Khalil M, et al. Contractile properties of early human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes: beta-adrenergic stimulation induces positive chronotropy and lusitropy but not inotropy. *Stem Cells Dev*. 2012;21(12):2111-2121. doi:10.1089/SCD.2011.0312
28. Huebsch N, Loskill P, Deveshwar N, et al. Miniaturized iPS-Cell-Derived Cardiac Muscles for Physiologically Relevant Drug Response Analyses. *Sci Rep*. 2016;20(6):1-12. doi:10.1038/SREP24726

## Bibliografia

29. Ronaldson-Bouchard K, Ma SP, Yeager K, et al. Advanced maturation of human cardiac tissue grown from pluripotent stem cells. *Nature*. 2018;556(7700):239-243. doi:10.1038/S41586-018-0016-3
30. Kim CW, Aronow WS, Dutta T, Frenkel D, Frishman WH. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Cardiol Rev*. 2020;28(6):325-331. doi:10.1097/CRD.0000000000000302
31. Baltogiannis GG, Lysitsas DN, di Giovanni G, et al. CPVT: Arrhythmogenesis, Therapeutic Management, and Future Perspectives. A Brief Review of the Literature. *Front Cardiovasc Med*. 2019;6(92):92-95. doi:10.3389/FCVM.2019.00092
32. Reid DS, Tynan M, Braidwood L, Fitzgerald GR. Bidirectional tachycardia in a child. A study using His bundle electrography. *Br Heart J*. 1975;37(3):339-344. doi:10.1136/HRT.37.3.339
33. Coumel, P.; Fidelle, J.; Lucet V. Catecholamine-induced severe ventricular arrhythmias with Adams-Stokes syndrome in children : report of four cases. *Br Heart J*. 1978;40:28-37.
34. Sumitomo N. Current topics in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Arrhythm*. 2016;32(5):344-351. doi:10.1016/J.JOA.2015.09.008
35. Pflaumer A, Wilde AAM, Charafeddine F, Davis AM. 50 Years of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia (CPVT) - Time to Explore the Dark Side of the Moon. *Heart Lung Circ*. 2020;29(4):520-528. doi:10.1016/J.HLC.2019.10.013
36. Roston TM, Cunningham TC, Sanatani S. Advances in the diagnosis and treatment of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cardiol Young*. 2017;27(S1):S49-S56. doi:10.1017/S1047951116002237
37. Lieve K v., Leenhardt A, van der Werf C. Catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. In: *Clinical Cardiogenetics: Second Edition*. Vol 80. ; 2016:193-200. doi:10.1007/978-3-319-44203-7\_12

## Bibliografia

38. Leenhardt A, Lucet V, Denjoy I, Grau F, Dien Do Ngoc, Coumel P. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia in Children. *Circulation*. 1995;91(5):1512-1519. doi:10.1161/01.CIR.91.5.1512
39. Swan H, Piippo K, Viitasalo M, et al. Arrhythmic disorder mapped to chromosome 1q42–q43 causes malignant polymorphic ventricular tachycardia in structurally normal hearts. *J Am Coll Cardiol*. 1999;34(7):2035-2042. doi:10.1016/S0735-1097(99)00461-1
40. Priori SG, Napolitano C, Tiso N, et al. Mutations in the cardiac ryanodine receptor gene (hRyR2) underlie catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001;103(2):196-200. doi:10.1161/01.CIR.103.2.196
41. Laitinen PJ, Brown KM, Piippo K, et al. Mutations of the cardiac ryanodine receptor (RyR2) gene in familial polymorphic ventricular tachycardia. *Circulation*. 2001;103(4):485-490. doi:10.1161/01.CIR.103.4.485
42. Lahat H, Eldar M, Levy-Nissenbaum E, et al. Autosomal recessive catecholamine- or exercise-induced polymorphic ventricular tachycardia: clinical features and assignment of the disease gene to chromosome 1p13-21. *Circulation*. 2001;103(23):2822-2827. doi:10.1161/01.CIR.103.23.2822
43. Lahat H, Pras E, Eldar M. A missense mutation in CASQ2 is associated with autosomal recessive catecholamine-induced polymorphic ventricular tachycardia in Bedouin families from Israel. *Ann Med*. 2004;36(SUPPL. 1):87-91. doi:10.1080/17431380410032517
44. Bhuiyan ZA, Hamdan MA, Shamsi ETA, et al. A novel early onset lethal form of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia maps to chromosome 7p14-p22. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2007;18(10):1060-1066. doi:10.1111/J.1540-8167.2007.00913.X
45. Nyegaard M, Overgaard MT, Sondergaard MT, et al. Mutations in calmodulin cause ventricular tachycardia and sudden cardiac death. *Am J Hum Genet*. 2012;91(4):703-712. doi:10.1016/J.AJHG.2012.08.015

## Bibliografia

46. Gomez-Hurtado N, Boczek NJ, Kryshnal DO, et al. Novel CPVT-Associated Calmodulin Mutation in CALM3 (CALM3-A103V) Activates Arrhythmogenic Ca Waves and Sparks. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2016;9(8). doi:10.1161/CIRCEP.116.004161
47. Makita N, Yagihara N, Crotti L, et al. Novel Calmodulin (CALM2) Mutations Associated with Congenital Arrhythmia Susceptibility. *Circ Cardiovasc Genet.* 2014;7(4):466-474. doi:10.1161/CIRCGENETICS.113.000459
48. Jensen HH, Brohus M, Nyegaard M, Overgaard MT. Human Calmodulin Mutations. *Front Mol Neurosci.* 2018;11:396. doi:10.3389/FNMOL.2018.00396
49. Rooryck C, Kyndt F, Bozon D, et al. New Family With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Linked to the Triadin Gene. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2015;26(10):1146-1150. doi:10.1111/JCE.12763
50. Moscu-Gregor A, Marschall C, Müntjes C, et al. Novel variants in TECRL cause recessive inherited CPVT type 3 with severe and variable clinical symptoms. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2020;31(6):1527-1535. doi:10.1111/JCE.14446
51. Walsh R, Adler A, Amin AS, et al. Evaluation of gene validity for CPVT and short QT syndrome in sudden arrhythmic death. *Eur Heart J.* 2022;43(15):1500-1510. doi:10.1093/EURHEARTJ/EHAB687
52. Song J, Luo Y, Jiang Y, He J. Advances in the Molecular Genetics of Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Front Pharmacol.* 2021;12:718208. doi:10.3389/FPHAR.2021.718208
53. Lieve K v., van der werf C, Wilde AA. Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circ J.* 2016;80(6):1285-1291. doi:10.1253/CIRCJ.CJ-16-0326
54. Giudicessi JR, Ackerman MJ. Determinants of incomplete penetrance and variable expressivity in heritable cardiac arrhythmia syndromes. *Transl Res.* 2013;161(1):1-14. doi:10.1016/J.TRSL.2012.08.005
55. Bauce B, Rampazzo A, Basso C, et al. Screening for ryanodine receptor type 2 mutations in families with effort-induced polymorphic ventricular arrhythmias

## Bibliografia

- and sudden death: early diagnosis of asymptomatic carriers. *J Am Coll Cardiol.* 2002;40(2):341-349. doi:10.1016/S0735-1097(02)01946-0
56. Haugaa KH, Leren IS, Berge KE, et al. High prevalence of exercise-induced arrhythmias in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation-positive family members diagnosed by cascade genetic screening. *EP Europace.* 2010;12(3):417-423. doi:10.1093/EUROPACE/EUP448
57. van der Werf C, Nederend I, Hofman N, et al. Familial evaluation in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: disease penetrance and expression in cardiac ryanodine receptor mutation-carrying relatives. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2012;5(4):748-756. doi:10.1161/CIRCEP.112.970517
58. Tester DJ, Dura M, Carturan E, et al. A mechanism for sudden infant death syndrome (SIDS): Stress-induced leak via ryanodine receptors. *Heart Rhythm.* 2007;4(6):733. doi:10.1016/J.HRTHM.2007.02.026
59. Marian AJ. Causality in genetics: the gradient of genetic effects and back to Koch's postulates of causality. *Circ Res.* 2014;114(2):e18-e21. doi:10.1161/CIRCRESAHA.114.302904
60. Liu N, Rizzi N, Boveri L, Priori SG. Ryanodine receptor and calsequestrin in arrhythmogenesis: what we have learnt from genetic diseases and transgenic mice. *J Mol Cell Cardiol.* 2009;46(2):149-159. doi:10.1016/J.YJMCC.2008.10.012
61. Liu N, Colombi B, Memmi M, et al. Arrhythmogenesis in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: insights from a RyR2 R4496C knock-in mouse model. *Circ Res.* 2006;99(3):292-298. doi:10.1161/01.RES.0000235869.50747.E1
62. Jiang D, Xiao B, Yang D, et al. RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death reduce the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release (SOICR). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(35):13062-13067. doi:10.1073/PNAS.0402388101



## Bibliografia

63. Li Y, Wei J, Guo W, et al. Human RyR2 (Ryanodine Receptor 2) Loss-of-Function Mutations: Clinical Phenotypes and In Vitro Characterization. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2021;14(9):874-885. doi:10.1161/CIRCEP.121.010013
64. Zhao YT, Valdivia CR, Gurrola GB, et al. Arrhythmogenesis in a catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia mutation that depresses ryanodine receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112(13):E1669-E1677. doi:10.1073/PNAS.1419795112
65. Willis BC, Pandit S v., Ponce-Balbuena D, et al. Constitutive Intracellular Na<sup>+</sup> Excess in Purkinje Cells Promotes Arrhythmogenesis at Lower Levels of Stress Than Ventricular Myocytes From Mice With Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation.* 2016;133(24):2348-2359. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.116.021936
66. Meissner G. Molecular regulation of cardiac ryanodine receptor ion channel. *Cell Calcium.* 2004;35(6):621-628. doi:10.1016/j.ceca.2004.01.015
67. Xu L, Mann G, Meissner G. Regulation of cardiac Ca<sup>2+</sup> release channel (ryanodine receptor) by Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. *Circ Res.* 1996;79(6):1100-1109. doi:10.1161/01.RES.79.6.1100
68. Györke I, Györke S. Regulation of the cardiac ryanodine receptor channel by luminal Ca<sup>2+</sup> involves luminal Ca<sup>2+</sup> sensing sites. *Biophys J.* 1998;75(6):2801-2810. doi:10.1016/S0006-3495(98)77723-9
69. Qin J, Valle G, Nani A, et al. Luminal Ca<sup>2+</sup> regulation of single cardiac ryanodine receptors: insights provided by calsequestrin and its mutants. *J Gen Physiol.* 2008;131(4):325-334. doi:10.1085/JGP.200709907
70. Priori SG, Napolitano C. Cardiac and skeletal muscle disorders caused by mutations in the intracellular Ca<sup>2+</sup> release channels. *Journal of Clinical Investigation.* 2005;115(8):2033-2038. doi:10.1172/JCI25664

## Bibliografia

71. Peng W, Shen H, Wu J, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2. *Science*. 2016;354(6310):301-312. doi:10.1126/SCIENCE.AAH5324
72. Guo W, Wei J, Estillore JP, et al. RyR2 disease mutations at the C-terminal domain intersubunit interface alter closed-state stability and channel activation. *J Biol Chem*. 2021;297(1):100808. doi:10.1016/J.JBC.2021.100808
73. Yan Z, Bai XC, Yan C, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution. *Nature*. 2015;517(7532):50-55. doi:10.1038/NATURE14063
74. Tung CC, Lobo PA, Kimlicka L, van Petegem F. The amino-terminal disease hotspot of ryanodine receptors forms a cytoplasmic vestibule. *Nature*. 2010;468(7323):585-588. doi:10.1038/NATURE09471
75. Liu Y, Sun B, Xiao Z, et al. Roles of the NH<sub>2</sub>-terminal Domains of Cardiac Ryanodine Receptor in Ca<sup>2+</sup> Release Activation and Termination. *J Biol Chem*. 2015;290(12):7736-7746. doi:10.1074/JBC.M114.618827
76. Bauerová-Hlinková V, Hajdúchová D, Bauer JA. Structure and Function of the Human Ryanodine Receptors and Their Association with Myopathies—Present State, Challenges, and Perspectives. *Molecules*. 2020;25(18):4040. doi:10.3390/MOLECULES25184040
77. Laver DR. Ca<sup>2+</sup> stores regulate ryanodine receptor Ca<sup>2+</sup> release channels via luminal and cytosolic Ca<sup>2+</sup> sites. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2007;34(9):889-896. doi:10.1111/J.1440-1681.2007.04708.X
78. Walweel K, Li J, Molenaar P, et al. Differences in the regulation of RyR2 from human, sheep, and rat by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in the cytoplasm and in the lumen of the sarcoplasmic reticulum. *J Gen Physiol*. 2014;144(3):263-271. doi:10.1085/JGP.201311157
79. Laver DR. Regulation of the RyR channel gating by Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *Biophys Rev*. 2018;10(4):1087-1095. doi:10.1007/S12551-018-0433-4

## Bibliografia

80. Laver DR, O'Neill ER, Lamb GD. Luminal Ca<sup>2+</sup>-regulated Mg<sup>2+</sup> Inhibition of Skeletal RyRs Reconstituted as Isolated Channels or Coupled Clusters. *J Gen Physiol*. 2004;124(6):741-758. doi:10.1085/JGP.200409092
81. Yuan Q, Dridi H, Clarke OB, et al. RyR1-related myopathy mutations in ATP and calcium binding sites impair channel regulation. *Acta Neuropathol Commun*. 2021;9(1):186. doi:10.1186/S40478-021-01287-3
82. Thomas NL, Williams AJ. Pharmacology of ryanodine receptors and Ca<sup>2+</sup>-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Wiley Interdiscip Rev Membr Transp Signal*. 2012;1(4):383-397. doi:10.1002/WMTS.34
83. Kong H, Jones PP, Koop A, Zhang L, Duff HJ, Chen SRW. Caffeine Induces Ca<sup>2+</sup> Release by Reducing The Threshold for Luminal Ca<sup>2+</sup> Activation of the Ryanodine Receptor. *Biochem J*. 2008;414(3):441-452. doi:10.1042/BJ20080489
84. Reggiani C. Caffeine as a tool to investigate sarcoplasmic reticulum and intracellular calcium dynamics in human skeletal muscles. *J Muscle Res Cell Motil*. 2021;42(2):281-289. doi:10.1007/S10974-020-09574-7
85. Faggioni M, Knollmann BC. Calsequestrin 2 and arrhythmias. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012;302(6):H1250-H1260. doi:10.1152/AJPHEART.00779.2011
86. Wang Q, Michalak M. Calsequestrin. Structure, function, and evolution. *Cell Calcium*. 2020;90:102242. doi:10.1016/J.CECA.2020.102242
87. Knollmann BC, Chopra N, Hlaing T, et al. Casq2 deletion causes sarcoplasmic reticulum volume increase, premature Ca<sup>2+</sup> release, and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Journal of Clinical Investigation*. 2006;116(9):2510-2520. doi:10.1172/JCI29128
88. Györke S, Terentyev D. Modulation of ryanodine receptor by luminal calcium and accessory proteins in health and cardiac disease. *Cardiovasc Res*. 2008;77(2):245-255. doi:10.1093/CVR/CVM038
89. Terentyev D, Cala SE, Houle TD, et al. Triadin overexpression stimulates excitation-contraction coupling and increases predisposition to cellular

## Bibliografia

- arrhythmia in cardiac myocytes. *Circ Res.* 2005;96(6):651-658. doi:10.1161/01.RES.0000160609.98948.25
90. Yang CF, Tsai WC. Calmodulin: The switch button of calcium signaling. *Tzu-Chi Medical Journal.* 2022;34(1):15-22. doi:10.4103/TCMJ.TCMJ\_285\_20
91. Walweel K, Oo YW, Laver DR. The emerging role of calmodulin regulation of RyR2 in controlling heart rhythm, the progression of heart failure and the antiarrhythmic action of dantrolene. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2017;44(1):135-142. doi:10.1111/1440-1681.12669
92. Yu Q, Anderson DE, Kaur R, Fisher AJ, Ames JB. The Crystal Structure of Calmodulin Bound to the Cardiac Ryanodine Receptor (RyR2) at Residues Phe4246-Val4271 Reveals a Fifth Calcium Binding Site. *Biochemistry.* 2021;60(14):1088-1096. doi:10.1021/ACS.BIOCHEM.1C00152
93. Walweel K, Gomez-Hurtado N, Rebbeck RT, et al. Calmodulin inhibition of human RyR2 channels requires phosphorylation of RyR2-S2808 or RyR2-S2814. *J Mol Cell Cardiol.* 2019;130:96-106. doi:10.1016/J.YJMCC.2019.03.018
94. Guo T, Cornea RL, Huke S, et al. Kinetics of FKBP12.6 binding to ryanodine receptors in permeabilized cardiac myocytes and effects on Ca sparks. *Circ Res.* 2010;106(11):1743-1752. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.219816
95. Gonano LA, Jones PP. FK506-binding proteins 12 and 12.6 (FKBPs) as regulators of cardiac Ryanodine Receptors: Insights from new functional and structural knowledge. *Channels.* 2017;11(5):415-425. doi:10.1080/19336950.2017.1344799
96. Wehrens XHT, Lehnart SE, Huang F, et al. FKBP12.6 deficiency and defective calcium release channel (ryanodine receptor) function linked to exercise-induced sudden cardiac death. *Cell.* 2003;113(7):829-840. doi:10.1016/S0092-8674(03)00434-3
97. Marx SO, Reiken S, Hisamatsu Y, et al. PKA phosphorylation dissociates FKBP12.6 from the calcium release channel (ryanodine receptor): defective regulation in failing hearts. *Cell.* 2000;101(4):365-376. doi:10.1016/S0092-8674(00)80847-8

## Bibliografia

98. Xiao B, Sutherland C, Walsh MP, Chen SRW. Protein kinase A phosphorylation at serine-2808 of the cardiac Ca<sup>2+</sup>-release channel (ryanodine receptor) does not dissociate 12.6-kDa FK506-binding protein (FKBP12.6). *Circ Res.* 2004;94(4):487-495. doi:10.1161/01.RES.0000115945.89741.22
99. Gaburjakova J, Krejciova E, Gaburjakova M. Multisite phosphorylation of the cardiac ryanodine receptor: a random or coordinated event? *Pflugers Arch.* 2020;472(12):1793-1807. doi:10.1007/S00424-020-02473-3
100. MacDonnell SM, García-Rivas G, Scherman JA, et al. Adrenergic Regulation of Cardiac Contractility Does Not Involve Phosphorylation of the Cardiac Ryanodine Receptor at Serine 2808. *Circ Res.* 2008;102(8):e65-e72. doi:10.1161/CIRCRESAHA.108.174722
101. Shan J, Kushnir A, Betzenhauser MJ, et al. Phosphorylation of the ryanodine receptor mediates the cardiac fight or flight response in mice. *J Clin Invest.* 2010;120(12):4388-4398. doi:10.1172/JCI32726
102. Ullrich ND, Valdivia HH, Niggli E. PKA phosphorylation of cardiac ryanodine receptor modulates SR luminal Ca<sup>2+</sup> sensitivity. *J Mol Cell Cardiol.* 2012;53(1):33-42. doi:10.1016/J.YJMCC.2012.03.015
103. Wehrens XHT, Lehnart SE, Reiken S, Vest JA, Wronska A, Marks AR. Ryanodine receptor/calcium release channel PKA phosphorylation: a critical mediator of heart failure progression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(3):511-518. doi:10.1073/PNAS.0510113103
104. Bovo E, Huke S, Blatter LA, Zima A v. The effect of PKA-mediated phosphorylation of ryanodine receptor on SR Ca<sup>2+</sup> leak in ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2017;104:9-16. doi:10.1016/J.YJMCC.2017.01.015
105. Xiao B, Jiang MT, Zhao M, et al. Characterization of a novel PKA phosphorylation site, serine-2030, reveals no PKA hyperphosphorylation of the cardiac ryanodine receptor in canine heart failure. *Circ Res.* 2005;96(8):847-855. doi:10.1161/01.RES.0000163276.26083.E8

## Bibliografia

106. Potenza DM, Janicek R, Fernandez-Tenorio M, et al. Phosphorylation of the ryanodine receptor 2 at serine 2030 is required for a complete  $\beta$ -adrenergic response. *J Gen Physiol*. 2019;151(2):131-145. doi:10.1085/JGP.201812155
107. Erickson JR. Mechanisms of CaMKII Activation in the Heart. *Front Pharmacol*. 2014;5:59. doi:10.3389/FPHAR.2014.00059
108. Maier LS, Zhang T, Chen L, DeSantiago J, Brown JH, Bers DM. Transgenic CaMKII $\delta$ C overexpression uniquely alters cardiac myocyte Ca<sup>2+</sup> handling: reduced SR Ca<sup>2+</sup> load and activated SR Ca<sup>2+</sup> release. *Circ Res*. 2003;92(8):904-911. doi:10.1161/01.RES.0000069685.20258.F1
109. Uchinoumi H, Yang Y, Oda T, et al. CaMKII-dependent phosphorylation of RyR2 promotes targetable pathological RyR2 conformational shift. *J Mol Cell Cardiol*. 2016;98:62-72. doi:10.1016/J.YJMCC.2016.06.007
110. van Oort RJ, McCauley MD, Dixit SS, et al. Ryanodine Receptor Phosphorylation by CaMKII Promotes Life-Threatening Ventricular Arrhythmias in Mice with Heart Failure. *Circulation*. 2010;122(25):2669-2679. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.110.982298
111. Priori SG, Chen SRW. Inherited dysfunction of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> handling and arrhythmogenesis. *Circ Res*. 2011;108(7):871-883. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.226845
112. Xiao Z, Guo W, Sun B, et al. Enhanced Cytosolic Ca<sup>2+</sup> Activation Underlies a Common Defect of Central Domain Cardiac Ryanodine Receptor Mutations Linked to Arrhythmias. *J Biol Chem*. 2016;291(47):24528-24537. doi:10.1074/JBC.M116.756528
113. Jiang D, Wang R, Xiao B, et al. Enhanced store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release and channel sensitivity to luminal Ca<sup>2+</sup> activation are common defects of RyR2 mutations linked to ventricular tachycardia and sudden death. *Circ Res*. 2005;97(11):1173-1181. doi:10.1161/01.RES.0000192146.85173.4B
114. Jones PP, Jiang D, Bolstad J, et al. Endoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> measurements reveal that the cardiac ryanodine receptor mutations linked to cardiac arrhythmia

## Bibliografia

- and sudden death alter the threshold for store-overload-induced Ca<sup>2+</sup> release. *Biochem J.* 2008;412(1):171-178. doi:10.1042/BJ20071287
115. Lehnart SE, Mongillo M, Bellinger A, et al. Leaky Ca<sup>2+</sup> release channel/ryanodine receptor 2 causes seizures and sudden cardiac death in mice. *J Clin Invest.* 2008;118(6):2230-2245. doi:10.1172/JCI35346
  116. Cheung JW, Meli AC, Xie W, et al. Short-Coupled Polymorphic Ventricular Tachycardia At Rest Linked to a Novel Ryanodine Receptor (RyR2) Mutation: Leaky RyR2 Channels Under Non-Stress Conditions. *Int J Cardiol.* 2015;180:228-236. doi:10.1016/J.IJCARD.2014.11.119
  117. Meli AC, Refaat MM, Dura M, et al. A novel ryanodine receptor mutation linked to sudden death increases sensitivity to cytosolic calcium. *Circ Res.* 2011;109(3):281-290. doi:10.1161/CIRCRESAHA.111.244970
  118. Liu Y, Kimlicka L, Hiess F, et al. The CPVT-associated RyR2 mutation G230C enhances store overload-induced Ca<sup>2+</sup> release and destabilizes the N-terminal domains. *Biochem J.* 2013;454(1):123-131. doi:10.1042/BJ20130594
  119. Suetomi T, Yano M, Uchinoumi H, et al. Mutation-Linked Defective Inter-Domain Interactions within Ryanodine Receptor Cause Aberrant Ca<sup>2+</sup> Release Leading to Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *Circulation.* 2011;124(6):682-694. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.111.023259
  120. Jiang D, Jones PP, Davis DR, et al. Characterization of a novel mutation in the cardiac ryanodine receptor that results in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Channels.* 2010;4(4):302-310. doi:10.4161/chan.4.4.12666
  121. Sallam K, Kodo K, Wu JC. Modeling Inherited Cardiac Disorders: a Cell is Worth a Thousand Genes. *Circ J.* 2014;78(4):784-794. doi:10.1253/CIRCJ.CJ-14-0182
  122. Gurdon JB, Elsdale TR, Fischberg M. Sexually Mature Individuals of *Xenopus laevis* from the Transplantation of Single Somatic Nuclei. *Nature* 1958 182:4627. 1958;182(4627):64-65. doi:10.1038/182064a0

## Bibliografia

123. GURDON JB. The Developmental Capacity of Nuclei taken from Intestinal Epithelium Cells of Feeding Tadpoles. *Development*. 1962;10(4):622-640. doi:10.1242/DEV.10.4.622
124. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981 292:5819. 1981;292(5819):154-156. doi:10.1038/292154a0
125. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(12):7634-7638. doi:10.1073/PNAS.78.12.7634
126. Bongso A, Fong CY, Ng SC, Ratnam S. Isolation and culture of inner cell mass cells from human blastocysts. *Hum Reprod*. 1994;9(11):2110-2117. doi:10.1093/OXFORDJOURNALS.HUMREP.A138401
127. Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005;309(5739):1369-1373. doi:10.1126/SCIENCE.1116447
128. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676. doi:10.1016/J.CELL.2006.07.024
129. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-872. doi:10.1016/J.CELL.2007.11.019
130. Pushp P, Nogueira DES, Rodrigues CAV, Ferreira FC, Cabral JMS, Gupta MK. A Concise Review on Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes for Personalized Regenerative Medicine. *Stem Cell Rev Rep*. 2021;17(3):748-776. doi:10.1007/S12015-020-10061-2
131. Mummery CL, Zhang J, Ng ES, Elliott DA, Elefanty AG, Kamp TJ. Differentiation of Human ES and iPS Cells to Cardiomyocytes: A Methods Overview. *Circ Res*. 2012;111(3):344-358. doi:10.1161/CIRCRESAHA.110.227512



## Bibliografia

132. Lee MY, Cagavi Bozkulak E, Schliffke S, et al. High density cultures of embryoid bodies enhanced cardiac differentiation of murine embryonic stem cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2011;416(1-2):51-57. doi:10.1016/J.BBRC.2011.10.140
133. Lian X, Zhang J, Azarin SM, et al. Directed cardiomyocyte differentiation from human pluripotent stem cells by modulating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling under fully defined conditions. *Nature Protocols* 2013 8:1. 2012;8(1):162-175. doi:10.1038/nprot.2012.150
134. Burridge PW, Matsa E, Shukla P, et al. Chemically Defined and Small Molecule-Based Generation of Human Cardiomyocytes. *Nat Methods*. 2014;11(8):855-860. doi:10.1038/NMETH.2999
135. Lian X, Bao X, Zilberter M, et al. Chemically defined albumin-free human cardiomyocyte generation. *Nat Methods*. 2015;12(7):595-596. doi:10.1038/NMETH.3448
136. Lin Y, Linask KL, Mallon B, et al. Heparin Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells in Chemically Defined Albumin-Free Medium, Enabling Consistent Manufacture of Cardiomyocytes. *Stem Cells Transl Med*. 2017;6(2):527-538. doi:10.5966/SCTM.2015-0428
137. Sharma A, Li G, Rajarajan K, Hamaguchi R, Burridge PW, Wu SM. Derivation of highly purified cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells using small molecule-modulated differentiation and subsequent glucose starvation. *Journal of Visualized Experiments*. 2015;2015(97):52628. doi:10.3791/52628
138. Karbassi E, Fenix A, Marchiano S, et al. Cardiomyocyte maturation: advances in knowledge and implications for regenerative medicine. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(6):341-359. doi:10.1038/S41569-019-0331-X
139. Kane C, Couch L, Terracciano CMN. Excitation–contraction coupling of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Front Cell Dev Biol*. 2015;3(SEP):59. doi:10.3389/FCCELL.2015.00059
140. Snir M, Kehat I, Gepstein A, et al. Assessment of the ultrastructural and proliferative properties of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes.

## Bibliografia

- Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;285(6):H2355-H2363.  
doi:10.1152/AJPHEART.00020.2003
141. Lundy SD, Zhu WZ, Regnier M, Laflamme MA. Structural and Functional Maturation of Cardiomyocytes Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev.* 2013;22(14):1991-2002. doi:10.1089/SCD.2012.0490
142. Kamakura T, Makiyama T, Sasaki K, et al. Ultrastructural maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes in a long-term culture. *Circ J.* 2013;77(5):1307-1314. doi:10.1253/CIRCJ.CJ-12-0987
143. Fukushima H, Yoshioka M, Kawatou M, et al. Specific induction and long-term maintenance of high purity ventricular cardiomyocytes from human induced pluripotent stem cells. *PLoS One.* 2020;15(11):e0241287. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0241287
144. Kroll K, Chabria M, Wang K, Häusermann F, Schuler F, Polonchuk L. Electro-mechanical conditioning of human iPSC-derived cardiomyocytes for translational research. *Prog Biophys Mol Biol.* 2017;130(Pt B):212-222. doi:10.1016/J.PBIOMOLBIO.2017.07.003
145. LaBarge W, Mattappally S, Kannappan R, et al. Maturation of three-dimensional, hiPSC-derived cardiomyocyte spheroids utilizing cyclic, uniaxial stretch and electrical stimulation. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219442. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0219442
146. Gu X, Zhou F, Mu J. Recent Advances in Maturation of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes Promoted by Mechanical Stretch. *Med Sci Monit.* 2021;27:e931063-1. doi:10.12659/MSM.931063
147. Garbern JC, Helman A, Sereda R, et al. Inhibition of mTOR Signaling Enhances Maturation of Cardiomyocytes Derived From Human-Induced Pluripotent Stem Cells via p53-Induced Quiescence. *Circulation.* 2020;141(4):285-300. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.044205

## Bibliografia

148. Chirico N, Kessler EL, Maas R, et al. Small molecule-mediated rapid maturation of human induced pluripotent stem cell derived cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2022;118(Supplement 1). doi:10.1093/CVR/CVAC066.012
149. Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, et al. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121(12):1323-1330. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311920
150. Chattergoon NN, Giraud GD, Louey S, Stork P, Fowden AL, Thornburg KL. Thyroid hormone drives fetal cardiomyocyte maturation. *The FASEB Journal.* 2012;26(1):397-408. doi:10.1096/FJ.10-179895
151. Ivy JR, Carter RN, Zhao JF, et al. Glucocorticoids regulate mitochondrial fatty acid oxidation in fetal cardiomyocytes. *J Physiol.* 2021;599(21):4901-4924. doi:10.1113/JP281860
152. Wang L, Wada Y, Ballan N, et al. Triiodothyronine and dexamethasone alter potassium channel expression and promote electrophysiological maturation of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2021;161:130-138. doi:10.1016/J.YJMCC.2021.08.005
153. Biendarra-Tiegs SM, Secreto FJ, Nelson TJ. Addressing Variability and Heterogeneity of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1212:1-29. doi:10.1007/5584\_2019\_350
154. Churko JM, Garg P, Treutlein B, et al. Defining human cardiac transcription factor hierarchies using integrated single-cell heterogeneity analysis. *Nature Communications 2018 9:1.* 2018;9(1):1-14. doi:10.1038/s41467-018-07333-4
155. Selga E, Sendfeld F, Martinez-Moreno R, et al. Sodium channel current loss of function in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a Brugada syndrome patient. *J Mol Cell Cardiol.* 2018;114:10-19. doi:10.1016/J.YJMCC.2017.10.002

## Bibliografia

156. Boheler KR, Poon ENY. Cell surface markers for immunophenotyping human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *Pflugers Arch.* 2021;473(7):1023-1039. doi:10.1007/S00424-021-02549-8
157. Rust W, Balakrishnan T, Zweigerdt R. Cardiomyocyte enrichment from human embryonic stem cell cultures by selection of ALCAM surface expression. *Regenerative Med.* 2009;4(2):225-237. doi:10.2217/17460751.4.2.225
158. Uosaki H, Fukushima H, Takeuchi A, et al. Efficient and Scalable Purification of Cardiomyocytes from Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells by VCAM1 Surface Expression. *PLoS One.* 2011;6(8):e23657. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0023657
159. Dubois NC, Craft AM, Sharma P, et al. SIRPA is a specific cell-surface marker for isolating cardiomyocytes derived from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* 2011;29(11):1011-1018. doi:10.1038/NBT.2005
160. Sleiman Y, Souidi M, Kumar R, et al. Modeling polymorphic ventricular tachycardia at rest using patient-specific induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *EBioMedicine.* 2020;60:1-15. doi:10.1016/J.EBIOM.2020.103024
161. Word TA, Quick AP, Miyake CY, et al. Efficacy of RyR2 inhibitor EL20 in induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes from a patient with catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Cell Mol Med.* 2021;25(13):6115-6124. doi:10.1111/JCMM.16521
162. Jung CB, Moretti A, Mederos y Schnitzler M, et al. Dantrolene rescues arrhythmogenic RYR2 defect in a patient-specific stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *EMBO Mol Med.* 2012;4(3):180-191. doi:10.1002/EMMM.201100194
163. Novak A, Barad L, Lorber A, et al. Functional abnormalities in iPSC-derived cardiomyocytes generated from CPVT1 and CPVT2 patients carrying ryanodine or calsequestrin mutations. *J Cell Mol Med.* 2015;19(8):2006-2018. doi:10.1111/JCMM.12581

## Bibliografia

164. Zhang XH, Wei H, Xia Y, Morad M. Calcium signaling consequences of RyR2 mutations associated with CPVT1 introduced via CRISPR/Cas9 gene editing in human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes: Comparison of RyR2-R420Q, F2483I, and Q4201R. *Heart Rhythm*. 2021;18(2):250-260. doi:10.1016/J.HRTHM.2020.09.007
165. di Pasquale E, Lodola F, Miragoli M, et al. CaMKII inhibition rectifies arrhythmic phenotype in a patient-specific model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *Cell Death Dis*. 2013;4(10):e843. doi:10.1038/CDDIS.2013.369
166. Kujala K, Paavola J, Lahti A, et al. Cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia reveals early and delayed afterdepolarizations. *PLoS One*. 2012;7(9):1-10. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0044660
167. Penttinen K, Swan H, Vanninen S, et al. Antiarrhythmic Effects of Dantrolene in Patients with Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia and Replication of the Responses Using iPSC Models. *PLoS One*. 2015;10(5):e0125366. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0125366
168. Paavola J, Väänänen H, Larsson K, et al. Slowed depolarization and irregular repolarization in catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia: a study from cellular Ca<sup>2+</sup> transients and action potentials to clinical monophasic action potentials and electrocardiography. *Europace*. 2016;18(10):1599-1607. doi:10.1093/EUROPACE/EUV380
169. Fatima A, Xu G, Shao K, et al. In vitro Modeling of Ryanodine Receptor 2 Dysfunction Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. 2011;28(4):579-592. doi:10.1159/000335753
170. Zhang XH, Haviland S, Wei H, et al. Ca<sup>2+</sup> signaling in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes (iPS-CM) from normal and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia (CPVT)-afflicted subjects. *Cell Calcium*. 2013;54(2):57-70. doi:10.1016/J.CECA.2013.04.004

## Bibliografia

171. Wei H, Zhang XH, Clift C, Yamaguchi N, Morad M. CRISPR/Cas9 Gene editing of RyR2 in human stem cell-derived cardiomyocytes provides a novel approach in investigating dysfunctional Ca<sup>2+</sup> signaling. *Cell Calcium*. 2018;73:104-111. doi:10.1016/J.CECA.2018.04.009
172. Pölönen RP, Penttinen K, Swan H, Aalto-Setälä K. Antiarrhythmic Effects of Carvedilol and Flecainide in Cardiomyocytes Derived from Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia Patients. *Stem Cells Int*. 2018;2018:1-11. doi:10.1155/2018/9109503
173. Pölönen RP, Swan H, Aalto-Setälä K. Mutation-specific differences in arrhythmias and drug responses in CPVT patients: simultaneous patch clamp and video imaging of iPSC derived cardiomyocytes. *Mol Biol Rep*. 2020;47(2):1067-1077. doi:10.1007/S11033-019-05201-Y
174. Sasaki K, Makiyama T, Yoshida Y, et al. Patient-Specific Human Induced Pluripotent Stem Cell Model Assessed with Electrical Pacing Validates S107 as a Potential Therapeutic Agent for Catecholaminergic Polymorphic Ventricular Tachycardia. *PLoS One*. 2016;11(10):1-17. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0164795
175. Acimovic I, Refaat MM, Moreau A, et al. Post-Translational Modifications and Diastolic Calcium Leak Associated to the Novel RyR2-D3638A Mutation Lead to CPVT in Patient-Specific hiPSC-Derived Cardiomyocytes. *J Clin Med*. 2018;7(11):423-444. doi:10.3390/JCM7110423
176. Preininger MK, Jha R, Maxwell JT, et al. A human pluripotent stem cell model of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia recapitulates patient-specific drug responses. *Dis Model Mech*. 2016;9(9):927-939. doi:10.1242/DMM.026823
177. Itzhaki I, Maizels L, Huber I, et al. Modeling of catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia with patient-specific human-induced pluripotent stem cells. *J Am Coll Cardiol*. 2012;60(11):990-1000. doi:10.1016/J.JACC.2012.02.066

## Bibliografia

178. Hopton C, Tijssen AJ, Maizels L, et al. Characterization of the mechanism by which a nonsense variant in RYR2 leads to disordered calcium handling. *Physiol Rep.* 2022;10(8):e15265. doi:10.14814/PHY2.15265
179. Tester DJ, John Kim CS, Hamrick SK, et al. Molecular characterization of the calcium release channel deficiency syndrome. *JCI Insight.* 2020;5(15):e135952. doi:10.1172/JCI.INSIGHT.135952
180. Liu Y, Wei J, Wong King Yuen SM, et al. CPVT-associated cardiac ryanodine receptor mutation G357S with reduced penetrance impairs Ca<sup>2+</sup> release termination and diminishes protein expression. *PLoS One.* 2017;12(9):e0184177. doi:10.1371/journal.pone.0184177
181. Degasperi A, Birtwistle MR, Volinsky N, Rauch J, Kolch W, Kholodenko BN. Evaluating strategies to normalise biological replicates of Western blot data. *PLoS One.* 2014;9(1):e87293. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0087293
182. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, et al. The RIN: An RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006;7(1):1-14. doi:10.1186/1471-2199-7-3/FIGURES/8
183. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics.* 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTP324
184. Broad Institute GR. Picard Toolkit. Published 2018. Picard Tools. Broad Institute. <http://broadinstitute.github.io/picard/>
185. McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res.* 2010;20(9):1297-1303. doi:10.1101/GR.107524.110
186. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin).* 2012;6(2):80-92. doi:10.4161/FLY.19695

## Bibliografia

187. Cingolani P, Patel VM, Coon M, et al. Using *Drosophila melanogaster* as a Model for Genotoxic Chemical Mutational Studies with a New Program, SnpSift. *Front Genet.* 2012;3(MAR):1-9. doi:10.3389/FGENE.2012.00035
188. Kazazian HH, Boehm CD, Seltzer WK. ACMG recommendations for standards for interpretation of sequence variations. *Genetics in Medicine.* 2000;2(5):302-303. doi:10.1097/00125817-200009000-00009
189. Richards CS, Bale S, Bellissimo DB, et al. ACMG recommendations for standards for interpretation and reporting of sequence variations: Revisions 2007. *Genet Med.* 2008;10(4):294-300. doi:10.1097/GIM.0B013E31816B5CAE
190. Richards S, Aziz N, Bale S, et al. Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med.* 2015;17(5):405-424. doi:10.1038/GIM.2015.30
191. Walsh R, Lahrouchi N, Tadros R, et al. Enhancing rare variant interpretation in inherited arrhythmias through quantitative analysis of consortium disease cohorts and population controls. *Genet Med.* 2021;23(1):47-58. doi:10.1038/S41436-020-00946-5
192. Ellard S, Baple EL, Callaway A, et al. ACGS Best Practice Guidelines for Variant Classification in Rare Disease 2020 Recommendations ratified by ACGS Quality Subcommittee on 4 th. Published online 2020. doi:10.1101/531210
193. Parikh SS, Blackwell DJ, Gomez-Hurtado N, et al. Thyroid and Glucocorticoid Hormones Promote Functional T-Tubule Development in Human-Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes. *Circ Res.* 2017;121(12):1323-1330. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311920
194. Escobar AL, Ribeiro-Costa R, Villalba-Galea C, Zoghbi ME, Pérez CG, Mejía-Alvarez R. Developmental changes of intracellular Ca<sup>2+</sup> transients in beating rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004;286(3):H971-H978. doi:10.1152/AJPHEART.00308.2003



## Bibliografia

195. Tanaka H, Shigenobu K. Effect of ryanodine on neonatal and adult rat heart: developmental increase in sarcoplasmic reticulum function. *J Mol Cell Cardiol.* 1989;21(12):1305-1313. doi:10.1016/0022-2828(89)90676-7
196. Seki S, Nagashima M, Yamada Y, et al. Fetal and postnatal development of Ca<sup>2+</sup> transients and Ca<sup>2+</sup> sparks in rat cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2003;58(3):535-548. doi:10.1016/S0008-6363(03)00255-4
197. Okudaira N, Kuwahara M, Hirata Y, Oku Y, Nishio H. A knock-in mouse model of N-terminal R420W mutation of cardiac ryanodine receptor exhibits arrhythmogenesis with abnormal calcium dynamics in cardiomyocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;452(3):665-668. doi:10.1016/J.BBRC.2014.08.132
198. Wilson AD, Hu J, Sigalas C, et al. The V2475F CPVT1 mutation yields distinct RyR2 channel populations that differ in their responses to cytosolic Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. *J Physiol.* 2021;599(23):5179-5201. doi:10.1113/JP281707
199. Wehrens XHT, Mathur N, Sood S, et al. Sudden Infant Death Syndrome in Mice with an Inherited Mutation in RyR2. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2009;2(6):677-685. doi:10.1161/CIRCEP.109.894683
200. Kimlicka L, Tung CC, Carlsson ACC, Lobo PA, Yuchi Z, van Petegem F. The Cardiac Ryanodine Receptor N-Terminal Region Contains an Anion Binding Site that Is Targeted by Disease Mutations. *Structure.* 2013;21(8):1440-1449. doi:10.1016/J.STR.2013.06.012
201. Baker MD, Nassar MA. Painful and painless mutations of SCN9A and SCN11A voltage-gated sodium channels. *Pflugers Arch.* 2020;472(7):865-880. doi:10.1007/S00424-020-02419-9
202. Coll M, Allegue C, Partemi S, et al. Genetic investigation of sudden unexpected death in epilepsy cohort by panel target resequencing. *Int J Legal Med.* 2016;130(2):331-339. doi:10.1007/S00414-015-1269-0
203. Marler TL, Wright AB, Elmslie KL, et al. NaV1.9 channels in muscle afferent neurons and axons. *J Neurophysiol.* 2018;120(3):1032-1044. doi:10.1152/JN.00573.2017

## Bibliografia

204. Tharp CA, Haywood ME, Sbaizero O, Taylor MRG, Mestroni L. The Giant Protein Titin's Role in Cardiomyopathy: Genetic, Transcriptional, and Post-translational Modifications of TTN and Their Contribution to Cardiac Disease. *Front Physiol.* 2019;10:1436. doi:10.3389/FPHYS.2019.01436
205. Hinson JT, Chopra A, Nafissi N, et al. Titin Mutations in iPS cells Define Sarcomere Insufficiency as a Cause of Dilated Cardiomyopathy. *Science.* 2015;349(6251):982-986. doi:10.1126/SCIENCE.AAA5458
206. Kenny PA, Liston EM, Higgins DG. Molecular evolution of immunoglobulin and fibronectin domains in titin and related muscle proteins. *Gene.* 1999;232(1):11-23. doi:10.1016/S0378-1119(99)00122-5
207. Schick R, Mekies LN, Shemer Y, et al. Functional abnormalities in induced Pluripotent Stem Cell-derived cardiomyocytes generated from titin-mutated patients with dilated cardiomyopathy. *PLoS One.* 2018;13(10):e0205719. doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0205719
208. Akinrinade O, Heliö T, Lekanne Deprez RH, et al. Relevance of Titin Missense and Non-Frameshifting Insertions/Deletions Variants in Dilated Cardiomyopathy. *Scientific Reports 2019 9:1.* 2019;9(1):1-9. doi:10.1038/s41598-019-39911-x

## **Annex**



## ÍNDIX DE CONTINGUT

ÍNDIX DE FIGURES.....	206
ÍNDIX DE TAULES.....	209
1. Criteris per a la classificació de variants genètiques.....	212
1.1 Descripció dels Criteris.....	212
1.2. Combinació dels criteris per assolir cadascuna de les classificacions.....	214
2. Caracterització de les línies iPSC generades.....	215
2.1. Tinció de fosfatasa alcalina i cariotips.....	215
2.2. Immunofluorescències dels marcadors de pluripotència.....	217
2.3. Immunofluorescència marcadors de diferenciació a endoderm, mesoderm i ectoderm.....	219
2.4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per immunofluorescències de marcadors de pluripotència i de cardiomiòcits.....	222
3. Els iPSC-CM mostren la repressió dels factors de transcripció de pluripotència respecte les seves iPSC.....	224
4. Els iPSC-CM mostren la sobreexpressió dels gens codificants per proteïnes citoesquelètiques cardíaques respecte les seves iPSC.....	227
5. Determinació del patró d'organització de troponina T i $\alpha$ -actinina als iPSC-CM.....	229
6. Avaluació de la puresa de les poblacions d'iPSC-CM mitjançant citometria de flux per troponina T i $\alpha$ -actinina.....	231
7. Resum de l'anàlisi comparatiu dels paràmetres analitzats dels transitoris induïts per estimulació elèctrica de camps entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S.....	234
8. Resum de l'anàlisi comparatiu dels paràmetres analitzats en els transitoris induïts per cafeïna 10 mM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S.....	237
9. Posició genòmica de les variants i transcrit utilitzat per l'anotació de les variants.	240



### ÍNDIX DE FIGURES

Figura S1. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-52.....	215
Figura S2. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-53.....	215
Figura S3. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-54.....	215
Figura S4. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-55.....	216
Figura S5. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu GPG1. ....	216
Figura S6. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-52.....	217
Figura S7. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-53.....	217
Figura S8. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-54.....	218
Figura S9. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-55.....	218
Figura S10. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu GPG1. ....	219
Figura S11. Immunohistoquímica de la diferenciació in vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-52. ....	219
Figura S12. Immunohistoquímica de la diferenciació in vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-53. ....	220
Figura S13. Immunohistoquímica de la diferenciació in vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-54. ....	220
Figura S14. Immunohistoquímica de la diferenciació in vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-55. ....	221
Figura S15. Immunohistoquímica de la diferenciació in vitro a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu GPG1. ....	221

## Annex: Índex de figures

Figura S16. Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren la repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte les iPSC. ....	224
Figura S17. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren la repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte les iPSC. ....	225
Figura S18. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren la repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte les iPSC. ....	225
Figura S19. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren la repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte les iPSC. ....	226
Figura S20. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren la repressió de l'expressió dels gens <i>SOX2</i> , <i>NANOG</i> i <i>POU5F1</i> respecte les iPSC. ....	226
Figura S21. Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte les iPSC. ....	227
Figura S22. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte les iPSC. ....	227
Figura S23. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte les iPSC. ....	228
Figura S24. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte les iPSC. ....	228
Figura S25. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren la sobreexpressió dels gens <i>TNNT2</i> i <i>ACTN2</i> respecte les iPSC. ....	228
Figura S26. Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	229
Figura S27. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	229
Figura S28. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	229
Figura S29. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	230
Figura S30. Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren marcatge organitzat de $\alpha$ -actinina i troponina T. ....	230
Figura S31. Llidars de fluorescència utilitzats pels experiments de citometria amb iPSC-CM respecte les dades obtingudes amb iPSC. ....	231



## Annex: Índex de figures

Figura S32. Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC del individu heterozigot CPVT-52 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules.. .....	232
Figura S33. Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC del individu homozigot CPVT-53 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules.. .....	233

## ÍNDIX DE TAULES

Taula S1. Anticossos primaris utilitzats per a les immunofluorescències de marcadors de pluripotència, endodèrmics, mesodèrmics i ectodèrmics. ....	222
Taula S2. Anticossos secundaris utilitzats per a les immunofluorescències de marcadors de pluripotència i marcadors endodèrmics, mesodèrmics i ectodèrmics. ....	223
Taula S3. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	234
Taula S4. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en presència d'ISO 100 nM dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	234
Taula S5. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de la durada al 50% del transitori de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camps en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	235
Taula S6. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA del temps d'alliberació 10-90% dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	235
Taula S7. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA del temps de recaptació 50-10% en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	235
Taula S8. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA del temps de recaptació 90-10% en condicions basals i en presència d'ISO 100nM dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	236
Taula S9. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de l'amplitud del transitori en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM dels transitoris de $Ca^{2+}$ induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	236

## Annex: Índex de taules

Taula S10. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S. ....	237
Taula S11. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en presència d'ISO 100nM dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S.. ....	237
Taula S12. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de la durada al 50% dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	238
Taula S13. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA del temps d'alliberació 10-90% dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	238
Taula S14. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de la durada del temps de recaptació 50-10% dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	238
Taula S15. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de la durada del temps de recaptació 90-10% dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	239
Taula S16. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb <i>One-Way</i> ANOVA de l'amplitud dels transitoris de Ca <sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2_p.G357S en heterozigosis i homozigosis. ....	239
Taula S17. Localització genòmica de les variants i transcrit utilitzat per l'anotació de les variants trobades a l'individu CPVT-51 i les compartides entre els individus CPVT-52 i CPVT-53. ....	240



### 1. Criteris per a la classificació de variants genètiques

#### 1.1 Descripció dels Criteris

- **Criteris sobre dades poblacionals:**

- BA1: La freqüència al·lèlica de la variant genètica és superior al 5% en les bases de dades de població general.
- BS1: La freqüència al·lèlica de la variant genètica és superior a l'esperada per la malaltia.
- PM2: La variant genètica és absent o té una freqüència extremadament baixa en controls en el Exome Sequencing Project, 1000 Genomes o ExAC.
- PS4: La prevalença en individus afectats és estadísticament superior respecte als controls.

- **Criteris sobre dades computacionals i predictives:**

- PVS1: Variants predites com a nul·les en un gen on la pèrdua de funció és un mecanisme descrit en la malaltia.
- PS1: Canvi de nucleòtid que a nivell de proteïna resulta en el mateix canvi d'aminoàcid que una variant classificada prèviament com a patogènica.
- PM5: Nova variant de canvi de sentit que ocorre a la mateixa posició d'aminoàcid que una altra considerada patogènica.
- PM4: La longitud de la proteïna canvia degut a INDELS *in frame* en una regió sense repeticions o per variants de pèrdua de codó STOP.
- BP3: INDELS *in frame* en una regió repetitiva sense funció coneguda.
- PP3: Múltiples línies predictores computacionals coincideixen en la predicció d'un efecte deleteri en el gen o en el producte genètic.
- BP4: Múltiples línies predictores computacionals coincideixen en el fet que la variant no té un efecte deleteri en el gen o en el producte genètic.
- BP7: Variant sinònima per la qual els algorismes predictors de *splicing* no preveuen impacte en la seqüència consens de *splicing*, no hi ha creació d'un nou lloc de *splicing* i el nucleòtid no és altament conservat.
- BP1: Variants de canvi de sentit en gens en els quals es coneix que els truncaments són la principal causa de la malaltia.

## Annex

- **Criteris sobre dades funcionals:**
  - PS3: Estudis funcionals *in vitro* o *in vivo* ben establerts mostren efecte perjudicial sobre el gen o producte gènic.
  - BS3: Estudis funcionals *in vitro* o *in vivo* ben establerts mostren que no hi ha un efecte perjudicial sobre el gen o producte gènic.
  - PM1: Variant localitzada en dominis de la proteïna coneguts per ser crítics en la funció de la proteïna i en els quals totes les variants de canvi de sentit són patogèniques.
  - PP2: Variants de canvi de sentit identificades en gens en els quals aquest tipus de variants són causa comuna de la malaltia i la presència de variants de canvi de sentit benignes és molt baixa.
- **Criteris de segregació:**
  - PP1: Co-segregació de la variant amb la malaltia en múltiples membres afectats en un gen amb associació clara amb la malaltia.
  - BS4: Falta de segregació de la variant en membres afectats de la família.
- **Criteris sobre dades *de novo*:**
  - PS2: Mutació *de novo* en un pacient amb malaltia però sense història familiar i amb paternitat i maternitat confirmades.
  - PM6: S'assumeix que la mutació és *de novo*, però la paternitat i maternitat no estan confirmades.
- **Criteris sobre dades al·lèliques:**
  - PM3: En malalties autosòmiques recessives, la presència d'una variant en cis (mateix al·lel) o en trans (diferents al·lells) amb una variant patogènica coneguda, pot considerar-se com a evidència de rol patogènic.
  - BP2: En malalties autosòmiques recessives, la presència d'una variant en cis (mateix al·lel) o en trans (diferents al·lells) amb una variant patogènica coneguda, pot considerar-se com a evidència de rol benigne.
- **Criteris sobre altres dades addicionals:**
  - PP4: El fenotip dels pacients o història familiar, és altament específica per una malaltia amb una sola etiologia genètica.

## Annex

### 1.2. Combinació dels criteris per assolir cadascuna de les classificacions

- **Patogènica (P):**
  - 1 Criteri patogènic *very strong* I
    - $\geq 1$  Criteri patogènic *strong* O
    - $\geq 2$  Criteris patogènics *moderate* O
    - 1 Criteri patogènic *moderate* I 1 Criteris patogènics *supporting* O
    - $\geq 2$  Criteris patogènics *supporting*
  - $\geq 2$  Criteris patogènics *Strong* O
  - 1 Criteri patogènic *strong* I
    - $\geq 3$  Criteris patogènics *moderate* O
    - 2 Criteris patogènics *moderate* i  $\geq 2$  Criteris patogènics *supporting* O
    - 1 Criteri patogènic *moderate* i  $\geq 4$  Criteris patogènics *supporting*
- **Possiblement patogènica (PP):**
  - 1 Criteri patogènic *very strong* I 1 Criteri patogènic *moderate* O
  - 1 Criteri patogènic *very strong* I 1 Criteri patogènic *supporting* O
  - 1 Criteri patogènic *strong* I 1-2 Criteris patogènics *moderate* O
  - 1 Criteri patogènic *strong* I  $\geq 2$  Criteris patogènics *supporting*
  - $\geq 3$  Criteris patogènics *moderate* O
  - 2 Criteris patogènics *moderate* I  $\geq 2$  Criteris patogènics *supporting* O
  - 1 Criteri patogènic *moderate* I  $\geq 4$  Criteris patogènics *supporting*
- **Possiblement Benigne (PB):**
  - 1 Criteri Benigne *strong* I 1 Criteri Benigne *supporting* O
  - $\geq 2$  Criteris Benignes *supporting*
- **Benigne (B):**
  - 1 Criteri Benigne *stand-alone* O
  - $\geq$  Criteris benignes *strong*
- **Variante de significat incert (VSI):** si no es compleixen cap de les combinacions anteriors o si els criteris patogènics i benignes són contradictoris.

## 2. Caracterització de les línies iPSC generades

### 2.1. Tinció de fosfatasa alcalina i cariotips

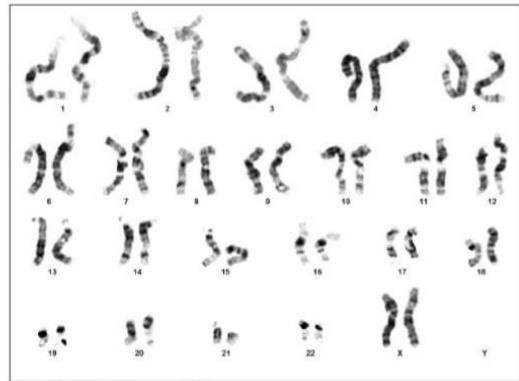
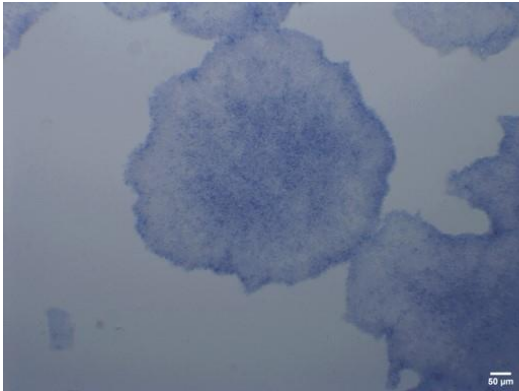


Figura S1. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-52.

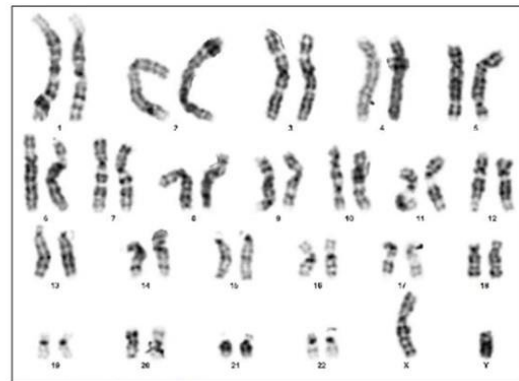
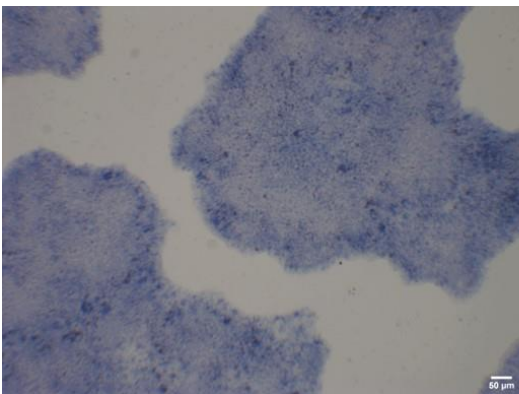


Figura S2. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-53.

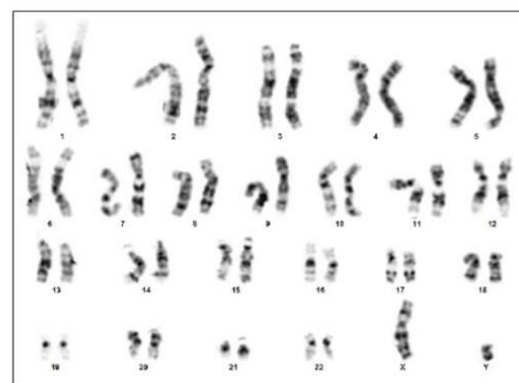
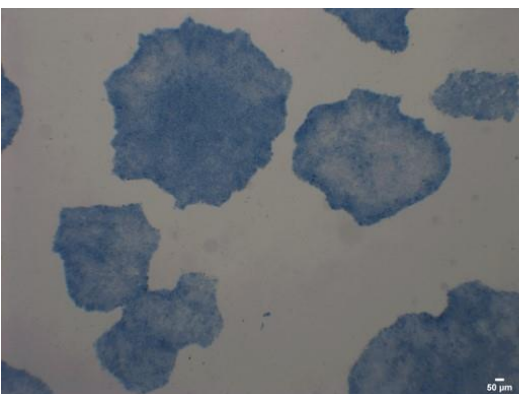


Figura S3. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-54.



## Annex

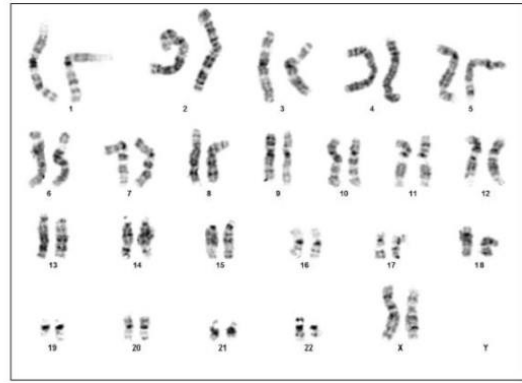
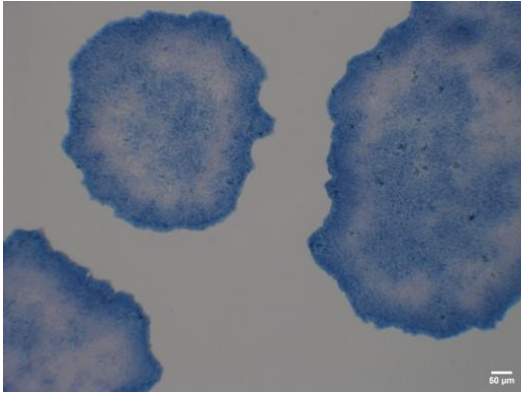


Figura S4. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu CPVT-55.

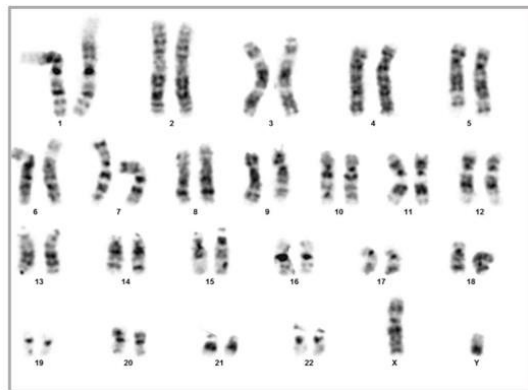
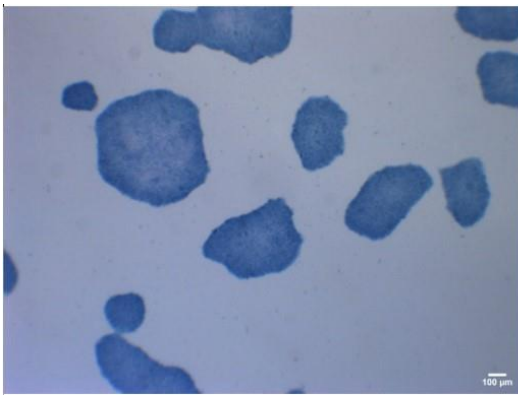


Figura S5. Tinció de la fosfatasa alcalina (esquerra) i cariotip (dreta) de la línia iPSC de l'individu GPG1.

2.2. Immunofluorescències dels marcadors de pluripotència

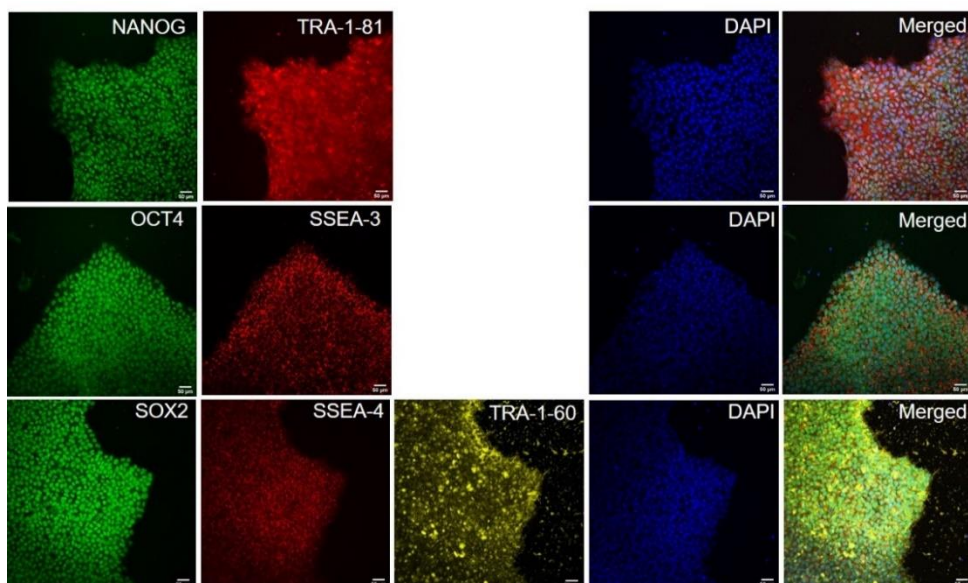


Figura S6. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-52. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

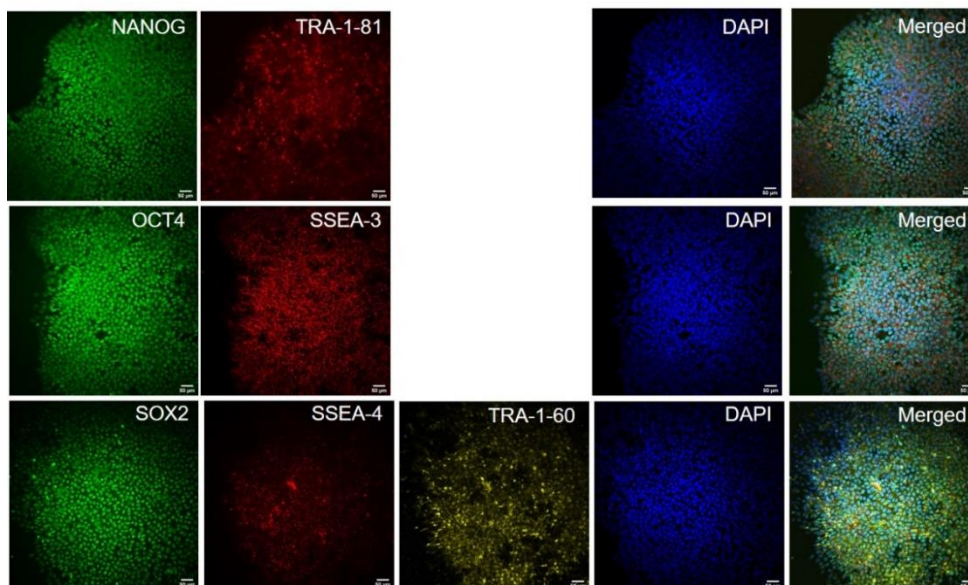
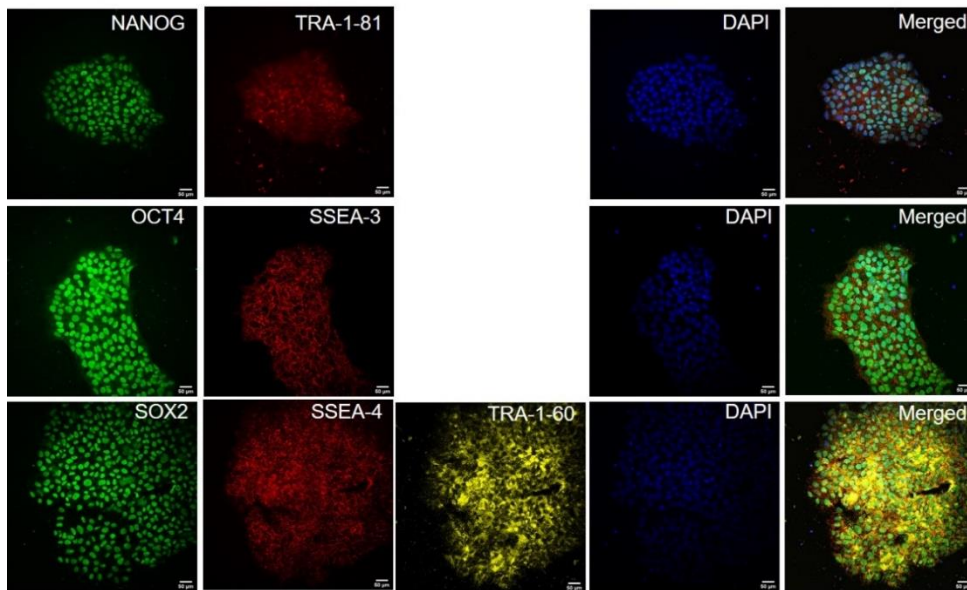
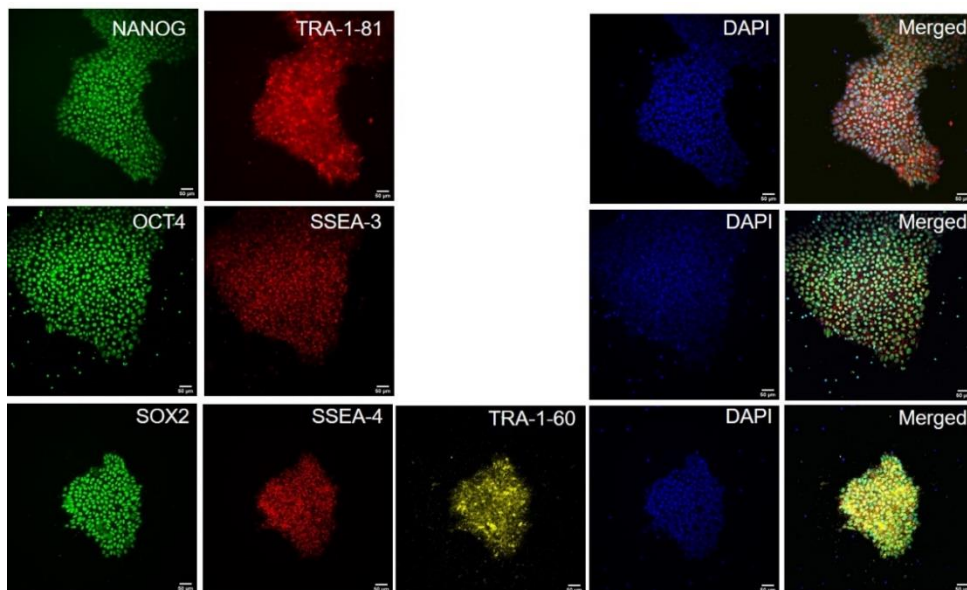


Figura S7. Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-53. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

## Annex

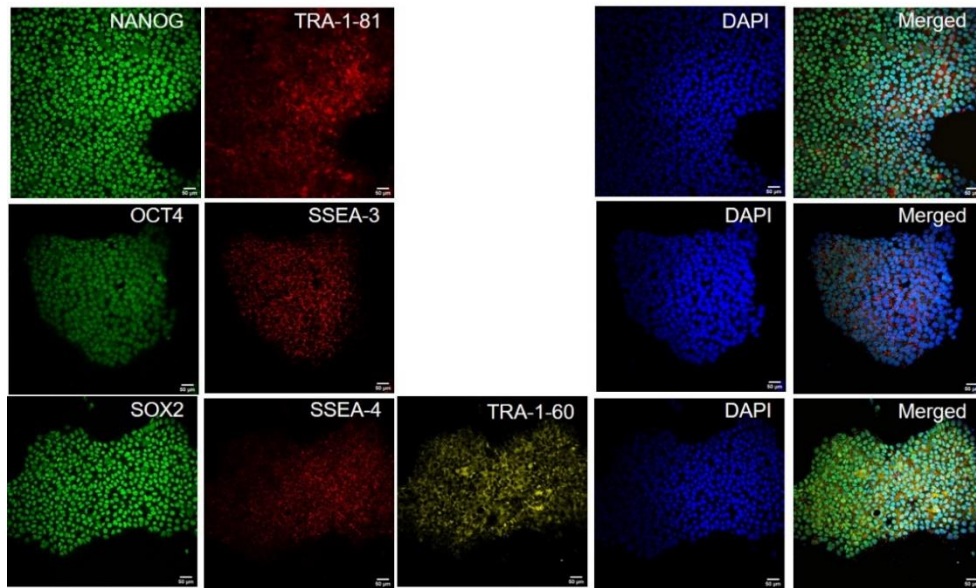


**Figura S8.** Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-54. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.



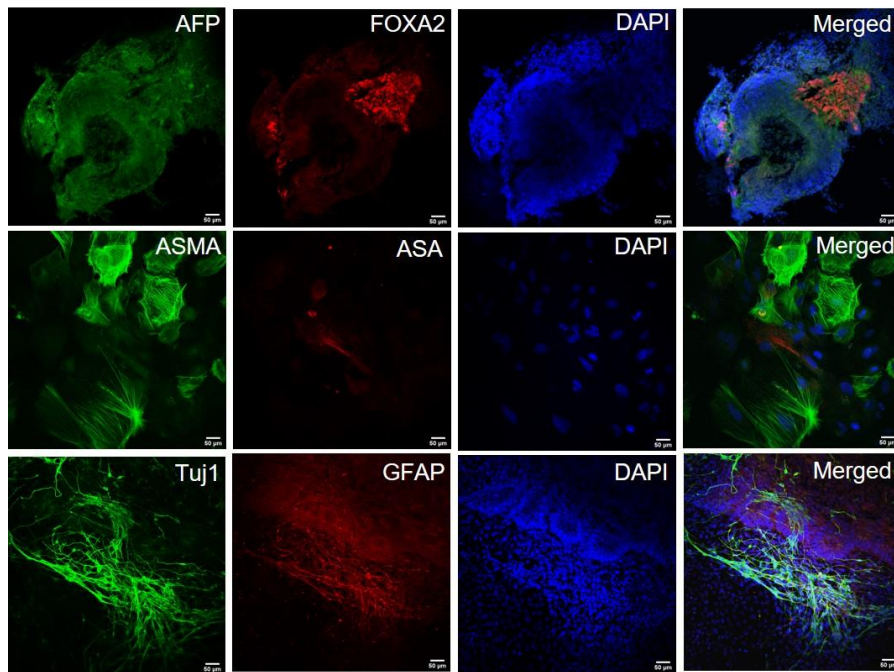
**Figura S9.** Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu CPVT-55. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

## Annex



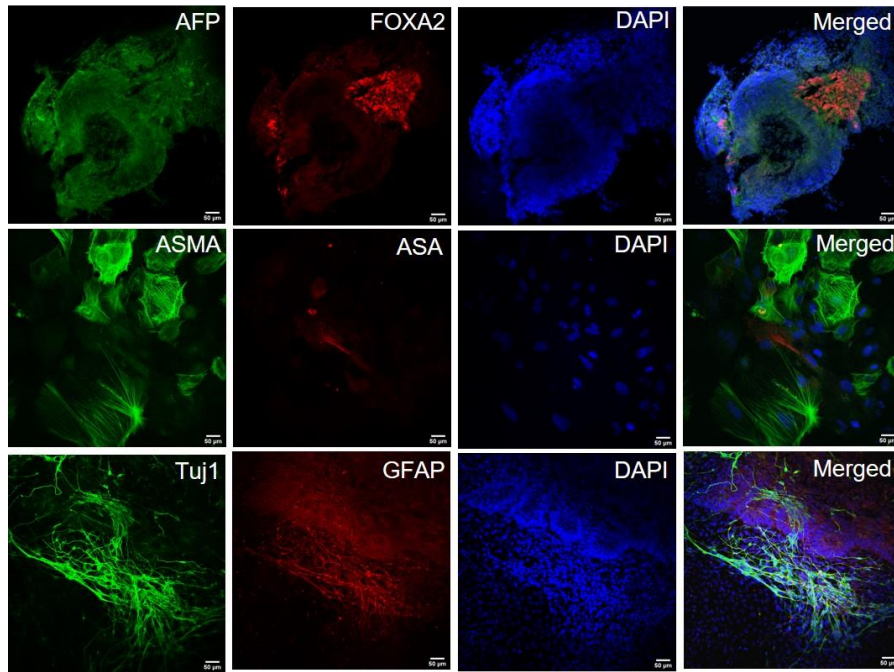
**Figura S10.** Immunofluorescència de marcadors de pluripotència de la línia iPSC de l'individu **GPG1**. Mostren marcatge positiu pels marcadors NANOG i TRA-1-81 (part superior), OCT4 i SSEA-3 (part mitja), SOX2, SSEA-4 i TRA-1-60 (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

### 2.3. Immunofluorescència marcadors de diferenciació a endoderm, mesoderm i ectoderm

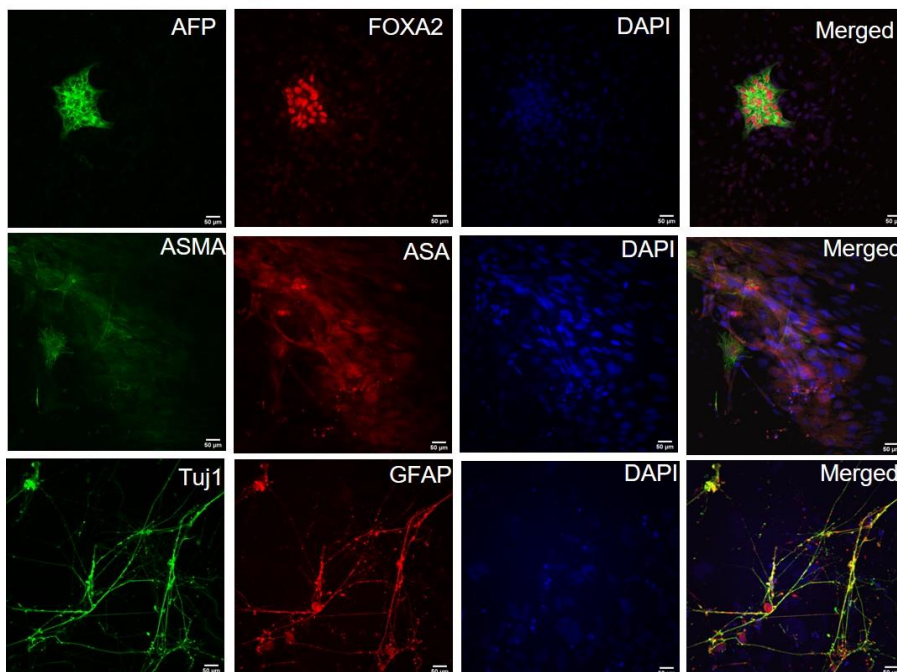


**Figura S11.** Immunohistoquímica de la diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu **CPVT-52**. La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la línia iPSC de l'individu CPVT-52 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), mesoderm (part mitja) i ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

## Annex

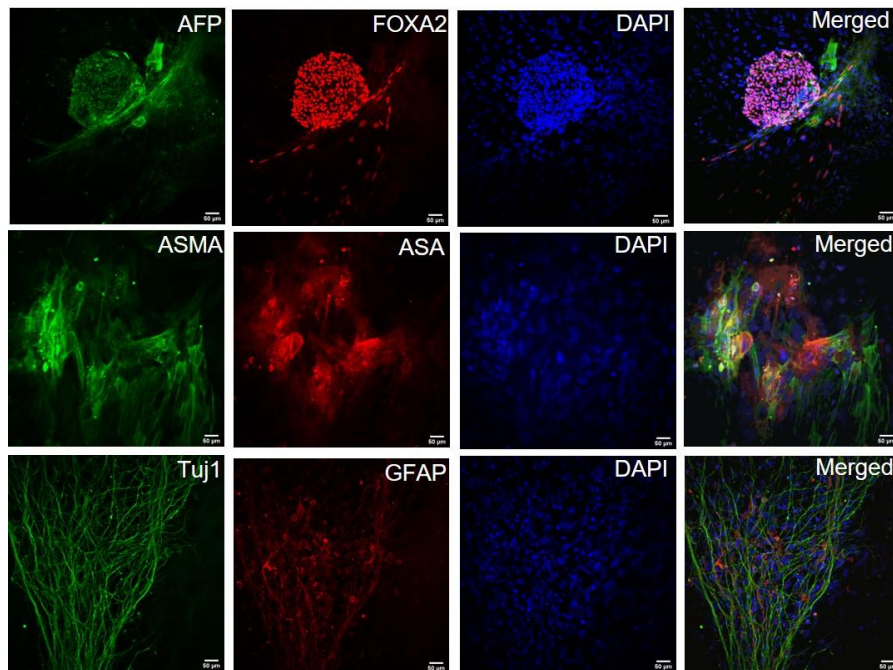


**Figura S12.** Immunohistoquímica de la diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-53. La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la línia iPSC de l'individu CPVT-53 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), mesoderm (part mitja) i ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

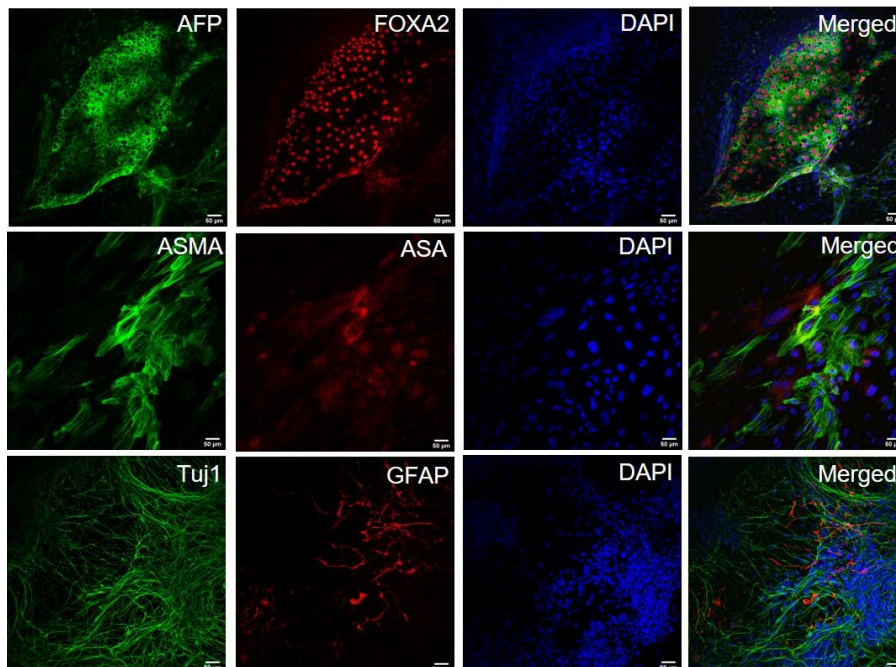


**Figura S13.** Immunohistoquímica de la diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-54. La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la línia iPSC de l'individu CPVT-54 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), mesoderm (part mitja) i ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

## Annex



**Figura S14.** Immunohistoquímica de la diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu CPVT-55. La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la línia iPSC de l'individu CPVT-55 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), mesoderm (part mitja) i ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.



**Figura S15.** Immunohistoquímica de la diferenciació *in vitro* a les tres capes germinals de la línia iPSC de l'individu GPG1. La diferenciació *in vitro* mostra la capacitat de la iPSC de l'individu línia GPG1 de diferenciar-se a tipus cel·lulars d'endoderm (part superior), mesoderm (part mitja) i ectoderm (part inferior). La barra de calibració equival a 50 µm.

## Annex

### 2.4. Anticossos primaris i secundaris utilitzats per immunofluorescències de marcadors de pluripotència i de cardiomiòcits

Taula S1. Anticossos primaris utilitzats per a les immunofluorescències de marcadors de pluripotència, endodèrmics, mesodèrmics i ectodèrmics.

	Anticòs	Dilució	Referència
Marcadors de pluripotència	anti-OCT4	1:2	sc-5279, Santa Cruz, Dallas, TX, EUA
	anti-NANOG	1:5	AF1997, R&D Systems, Minnesota, MN, EUA
	anti-SOX2	1:100	PA1-16968, ABR
	anti-SSEA3	1:1	MC-631, Hybridoma Bank, Iowa City, IA, EUA
	anti-SSEA4	1:1	MC-813-70, Hybridoma Bank
	anti-TRA-1-60	1:100	MAB4360, Millipore, Burlington, MA, EUA
	anti-TRA-1-81	1:100	MAB4381, Millipore
Marcadors de diferenciació	anti-TUJ1	1:40	MMS-435P, Covance-Biologeng, Dedham, MA, EUA
	anti-GFAP	1:1000	Z0334, Dako-Agilent Technologies
	anti-ASA	1:400	A2172, Sigma Aldrich- Merck
	Anti-ASMA	1:400	A5228, Sigm Aldrich-Merck
	anti-AFP	1:200	A0008, Agilent Technologies
	anti-FOXA2	1:50	AF2400, R&D Systems, Minneapolis, MN, EUA

## Annex

**Taula S2. Anticossos secundaris utilitzats per a les immunofluorescències de marcadors de pluripotència i marcadors endodèrmics, mesodèrmics i ectodèrmics.**

Anticòs	Dilució	Referència
AF488 Goat anti-Mouse	1:200	115-546-071, Jackson Immunoresearch, Cambridgeshire, Regne Unit
Cy3 Goat anti-Rat	1:200	112-165-020, Jackson Immunoresearch
AF488 Donkey anti-Rabbit	1:200	711-545-152, Jackson Immunoresearch
DyLight649 Goat anti-Mouse	1:200	115-495-075, Jackson Immunoresearch
AF488 Donkey anti-Goat	1:200	705-545-147, Jackson Immunoresearch
Cy3 Donkey anti-Mouse	1:200	715-165-140, Jackson Immunoresearch
Cy3 Donkey anti-Goat	1:200	705-165-147, Jackson Immunoresearch
AF488 Donkey anti-Mouse	1:200	715-545-151, Jackson Immunoresearch
Cy3 Donkey anti-Guinea pig	1:100	706-165-148, Jackson Immunoresearch
AF488 Goat anti-Mouse	1:200	115-546-071, Jackson Immunoresearch
Cy3 Goat anti-Mouse	1:200	115-165-075, Jackson Immunoresearch



### 3. Els iPSC-CM mostren la repressió dels factors de transcripció de pluripotència respecte les seves iPSC

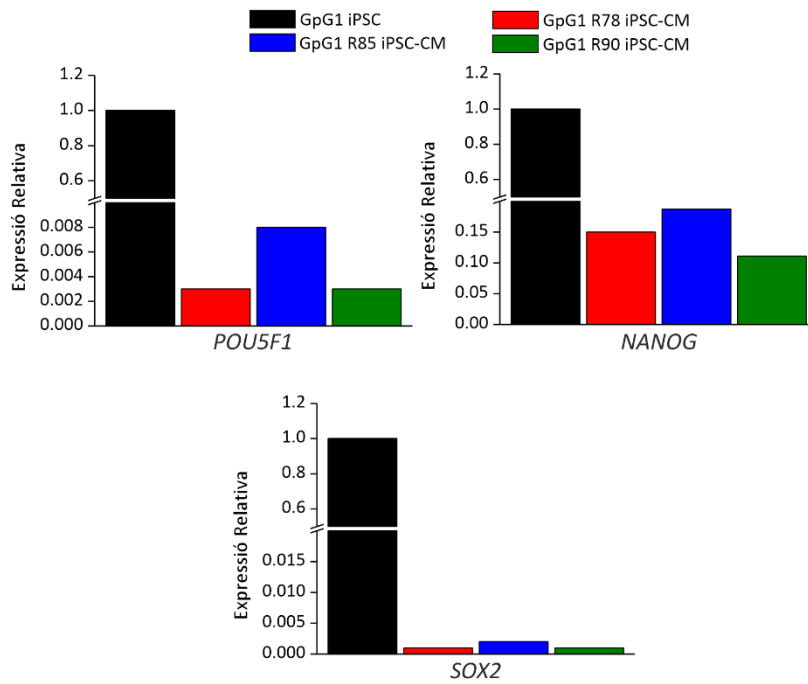
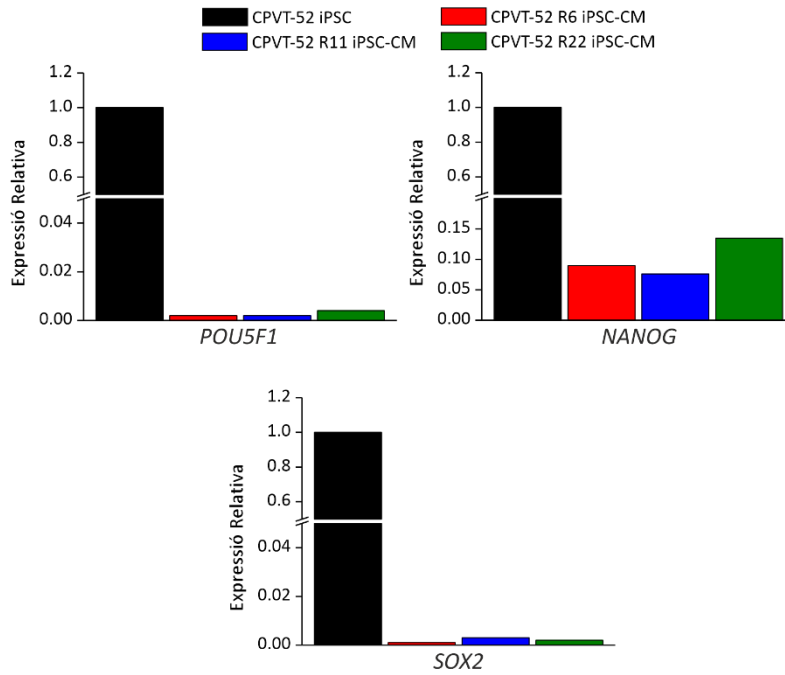
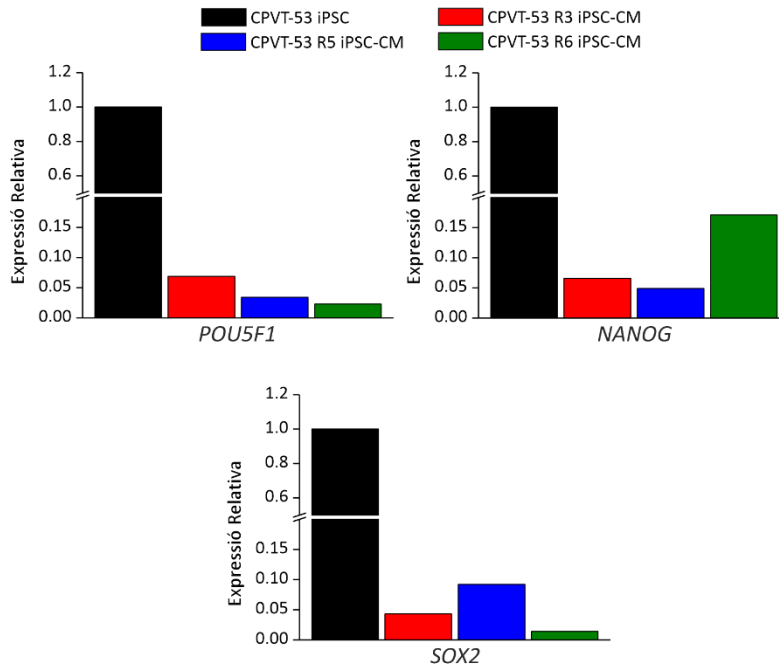


Figura S16. Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren la repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatius de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

## Annex

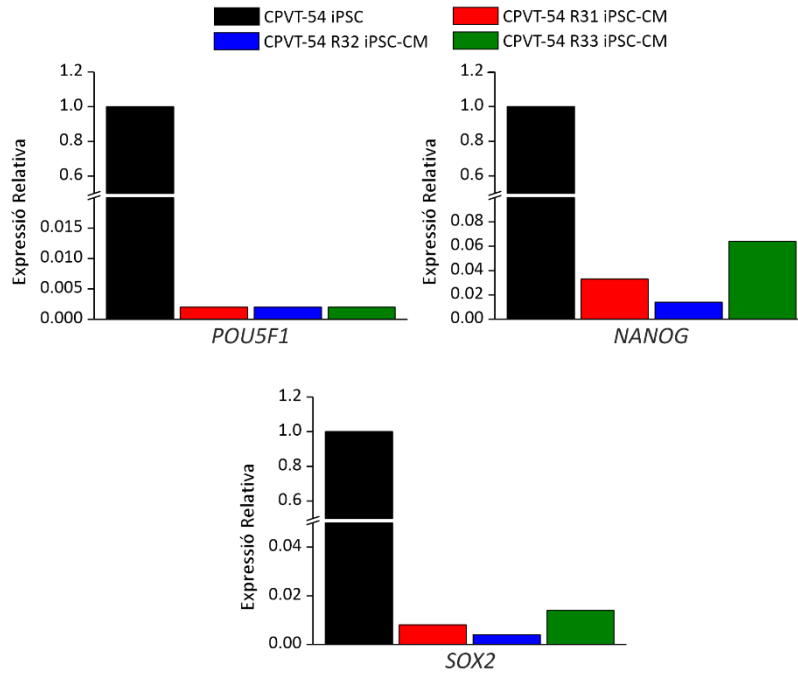


**Figura S17.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren la repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatiu de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

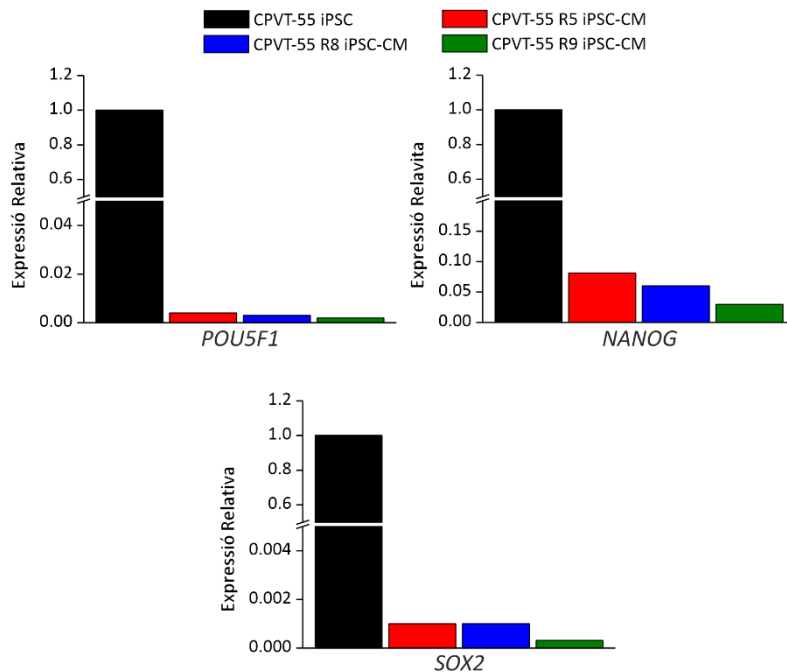


**Figura S18.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren la repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatiu de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

## Annex

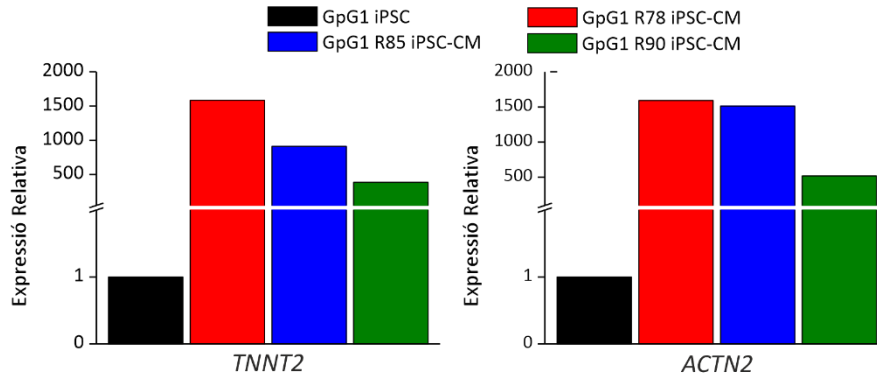


**Figura S19.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren la repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatiu de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

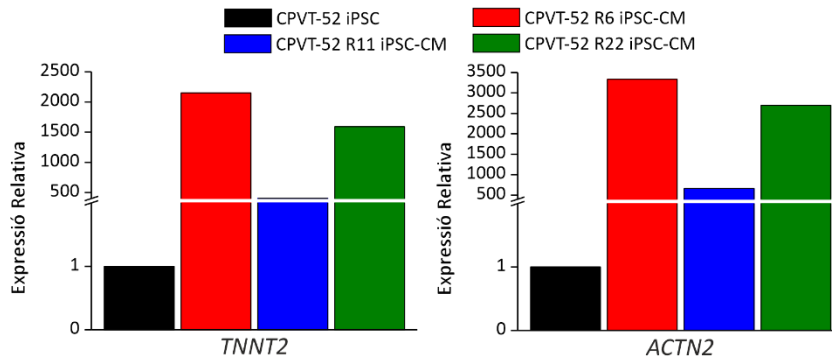


**Figura S20.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren la repressió de l'expressió dels gens *SOX2*, *NANOG* i *POU5F1* respecte a les iPSC. Es mostren els valors d'expressió relatiu de cada una de les diferenciacions independents normalitzats pels nivells d'expressió de les iPSC.

#### 4. Els iPSC-CM mostren la sobreexpressió dels gens codificants per proteïnes citoesquelètiques cardíques respecte les seves iPSC

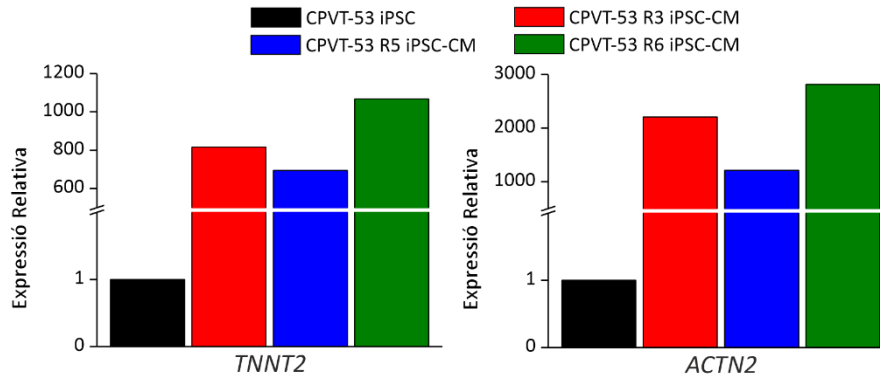


**Figura S21.** Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.

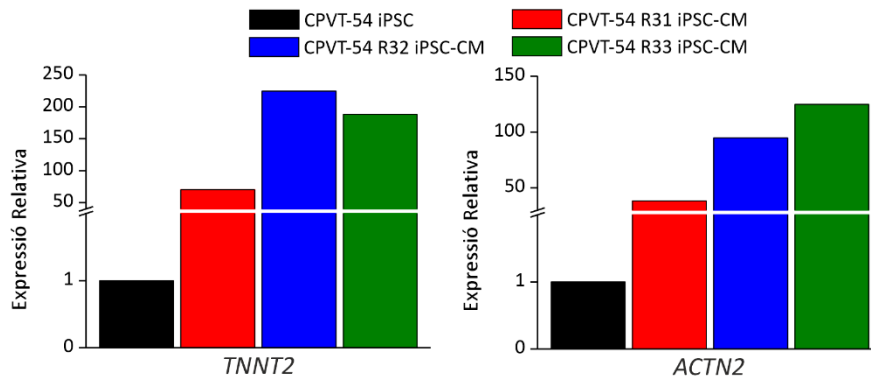


**Figura S22.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-52 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.

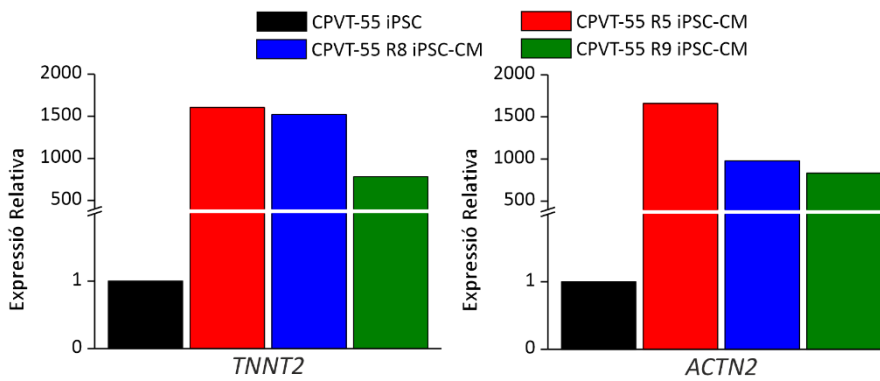
## Annex



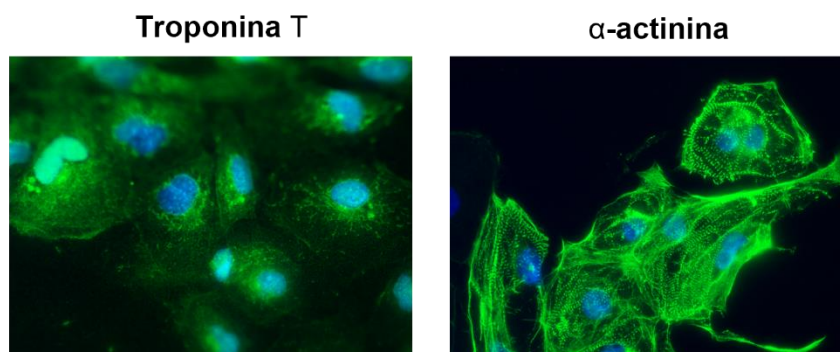
**Figura S23.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.



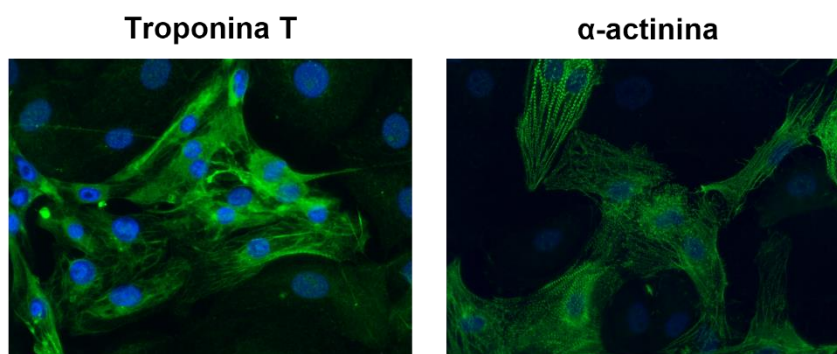
**Figura S24.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.



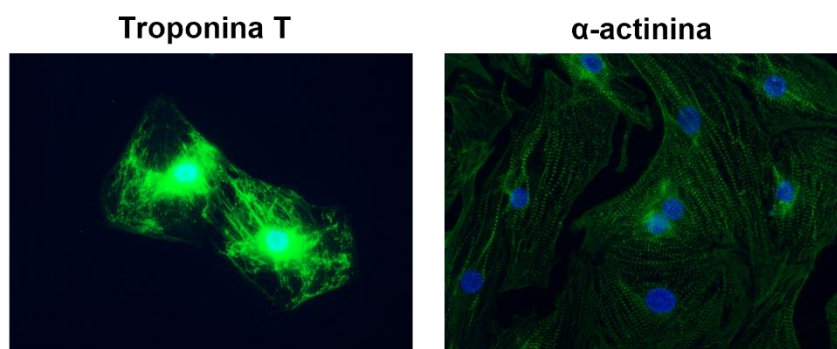
**Figura S25.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren la sobreexpressió dels gens *TNNT2* i *ACTN2* respecte a les iPSC. Es mostren els valors absoluts d'expressió per cada una de les diferenciacions independents normalitzats respecte als nivells d'expressió de les iPSC.

5. Determinació del patró d'organització de troponina T i  $\alpha$ -actinina als iPSC-CM

**Figura S26.** Els iPSC-CM de l'individu GPG1 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).

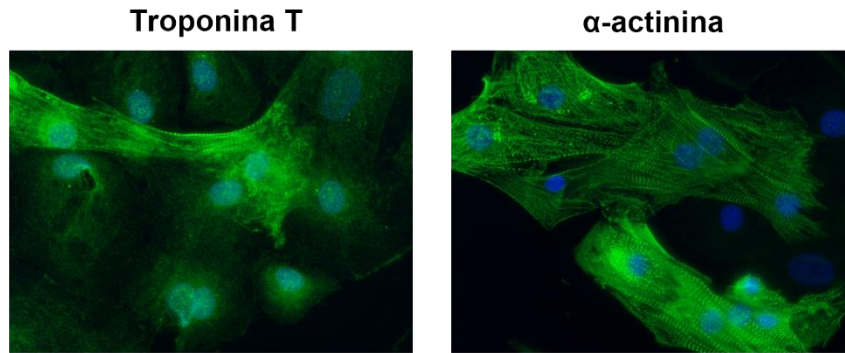


**Figura S27.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-51 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).

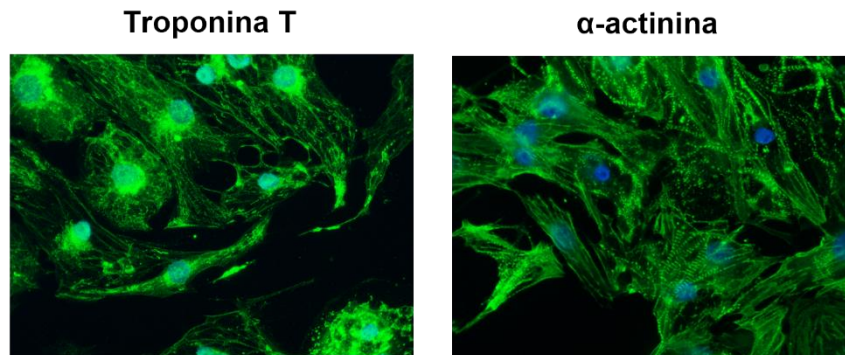


**Figura S28.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-53 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).

## Annex

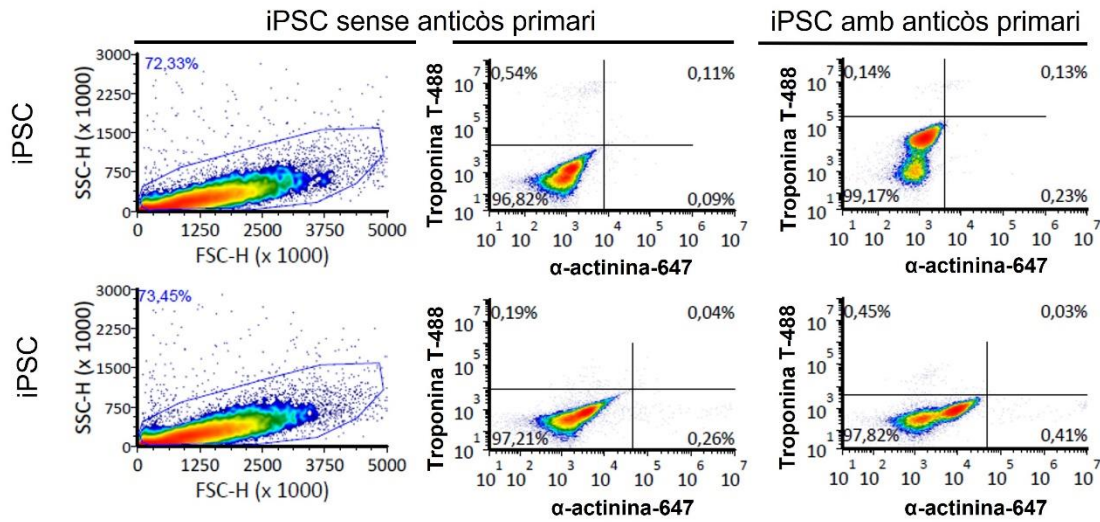


**Figura S29.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-54 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).



**Figura S30.** Els iPSC-CM de l'individu CPVT-55 mostren marcatge organitzat de  $\alpha$ -actinina i troponina T. Es mostra el patró de bandejat característic de les proteïnes citoesquelètiques  $\alpha$ -actinina i troponina T (verd) i la tinció dels nuclis amb DAPI (blau).

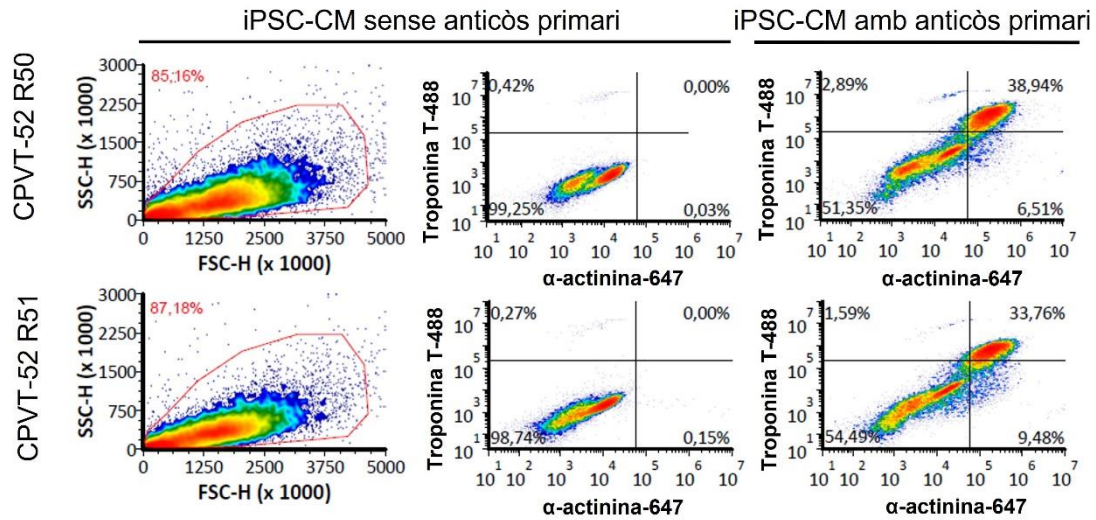
## 6. Avaluació de la puresa de les poblacions d'iPSC-CM mitjançant citometria de flux per troponina T i $\alpha$ -actinina



**Figura S31. Llindars de fluorescència utilitzats pels experiments de citometria amb iPSC-CM respecte les dades obtingudes amb iPSC.** “488” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 488 per a la seva detecció, i “647” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 647 per a la seva detecció. Es mostra la composició de la població analitzada segons mida (FSC-H) i complexitat citoplasmàtica (SSC-H) (esquerra), la mesura de la fluorescència de la població control únicament amb anticòs secundari (centre) i el marcatge d’iPSC per troponina T i  $\alpha$ -actinina (dreta). Els quadrants dels gràfics de fluorescència (dreta) representen no marcatge (quadrant inferior esquerra), marcatge únic per  $\alpha$ -actinina (quadrant inferior dret), marcatge només per troponina T (quadrant superior esquerra) i doble marcatge (quadrant superior dret).

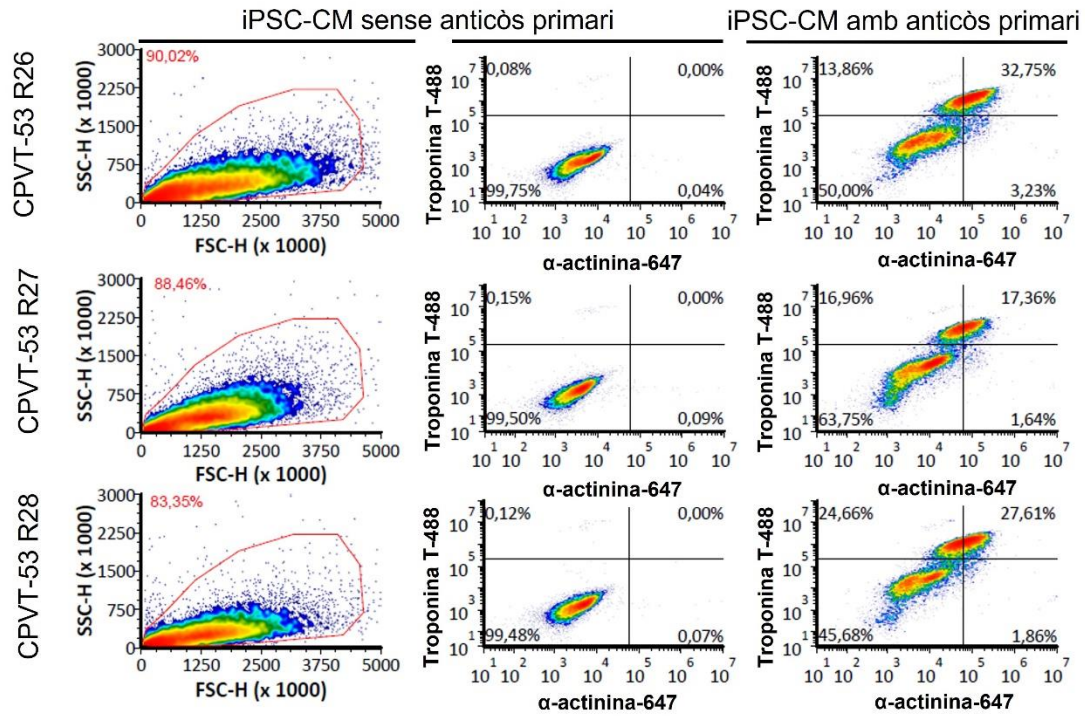


## Annex



**Figura S32.** Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC del individu heterozigot CPVT-52 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules. “488” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 488 per a la seva detecció, i “647” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 647 per a la seva detecció. Es mostra la composició de la població analitzada segons mida (FSC-H) i complexitat citoplasmàtica (SSC-H) (esquerra), la mesura de la fluorescència de la població control únicament amb anticòs secundari (centre) i el marcatge de cèl·lules per troponina T i  $\alpha$ -actinina (dreta). Els quadrants dels gràfics de fluorescència (dreta) representen no marcatge (quadrant inferior esquerra), marcatge únic per  $\alpha$ -actinina (quadrant inferior dret), marcatge només per troponina T (quadrant superior esquerra) i doble marcatge (quadrant superior dret).

## Annex



**Figura S33.** Les diferenciacions a iPSC-CM de la línia iPSC del individu homozigot CPVT-53 estan formades per quatre subpoblacions de cèl·lules. “488” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 488 per a la seva detecció, i “647” indica que s’ha marcat l’anticòs primari amb anticòs secundari Alexa Fluor 647 per a la seva detecció. Es mostra la composició de la població analitzada segons mida (FSC-H) i complexitat citoplasmàtica (SSC-H) (esquerra), la mesura de la fluorescència de la població control únicament amb anticòs secundari (centre) i el marcatge de cèl·lules per troponina T i  $\alpha$ -actinina (dreta). Els quadrants dels gràfics de fluorescència (dreta) representen no marcatge (quadrant inferior esquerra), marcatge únic per  $\alpha$ -actinina (quadrant inferior dret), marcatge només per troponina T (quadrant superior esquerra) i doble marcatge (quadrant superior dret).

## Annex

### 7. Resum de l'anàlisi comparatiu dels paràmetres analitzats dels transitoris induïts per estimulació elèctrica de camps entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S

Taula S3. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren la mitjana±ES de tots els iPSC-CM analitzats.

Basal						
Línia	n	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
GPG1	186	305.03±13.46	79.03±4.14	356.13±9.91	490.14±14.36	1.12±0.04
CPVT-51	319	386.47±8.15	125.14±3.93	498.90±8.08	692.15±12.13	1.29±0.04
CPVT-52	512	208.89±3.69	60.67±1.32	296.83±5.23	406.83±6.99	1.07±0.02
CPVT-53	930	211.93±2.80	62.73±0.97	247.48±3.51	351.64±4.68	1.08±0.02
CPVT-54	272	362.83±11.84	107.97±4.60	409.97±9.95	595.52±15.40	0.74±0.03
CPVT-55	181	274.31±7.01	83.26±2.66	360.50±8.47	490.00±11.10	1.28±0.03

Taula S4. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per estimulació elèctrica de camp en presència d'ISO 100 nM dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren la mitjana±ES de tots els iPSC-CM analitzats.

ISO 100 nM						
Línia	n	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
GPG1	274	254.91±8.01	68.23±2.66	379.80±9.39	514.08±13.24	1.26±0.03
CPVT-51	320	254.87±5.42	65.53±1.78	409.32±8.54	554.17±12.06	1.30±0.04
CPVT-52	605	155.84±3.48	48.18±1.16	231.26±5.34	313.36±7.12	1.10±0.03
CPVT-53	856	177.02±2.03	57.30±0.60	219.69±3.79	304.06±5.05	1.37±0.02
CPVT-54	370	282.92±7.66	75.00±2.48	375.55±10.54	533.92±15.47	0.81±0.03
CPVT-55	342	249.63±5.67	68.36±1.55	351.62±8.72	476.19±11.96	1.38±0.03

## Annex

Taula S5. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de la durada al 50% del transitori de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camps en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Durada al 50% transitori (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	8.33E-56				9.73E-45			
CPVT-53	1.43E-87	0.0007			2.74E-31	0.0009		
CPVT-54	0.8705	1.60E-39	8.32E-65		3.10E-03	4.43E-78	5.39E-62	
CPVT-55	3.69E-19	0.0251	4.92E-08	1.26E-12	1	5.11E-42	1.18E-28	0.0001

Taula S6. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA del temps d'alliberació 10-90% dels transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps d'alliberació 10-90% (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	7.90E-37				2.85E-14			
CPVT-53	2.96E-65	7.98E-05			0.0010	7.39E-07		
CPVT-54	0.1210	1.80E-20	8.05E-41		0.0012	4.55E-36	3.59E-18	
CPVT-55	2.48E-15	1	4.93E-05	7.81E-08	1	6.80E-20	6.15E-07	0.0719

Taula S7. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA del temps de recaptació 50-10% en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM dels transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps de recaptació 50-10% (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	1.57E-76				9.47E-65			
CPVT-53	1.47E-160	4.47E-24			1.79E-80	1		
CPVT-54	2.78E-17	1.18E-16	5.39E-63		0.038	1.70E-47	1.94E-61	
CPVT-55	2.33E-27	0.006	4.49E-24	0.010	6.23E-06	4.82E-32	1.68E-42	0.438

## Annex

Taula S8. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA del temps de recaptació 90-10% en condicions basals i en presència d'ISO 100nM dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps de recaptació 90-10% (ms)									
Línia	Basal				ISO 100 nM				
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	
CPVT-51									
CPVT-52	3.75E-101				2.83E-61				
CPVT-53	3.86E-163	2.60E-07			1.01E-72	1			
CPVT-54	7.40E-10	1.01E-42	7.03E-81		1	1.18E-56	2.04E-68		
CPVT-55	2.46E-32	9.63E-07	2.78E-20	9.74E-09	1.35E-05	2.62E-30	1.59E-37	0.0024	

Taula S9. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de l'amplitud del transitori en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per estimulació elèctrica de camp entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )									
Línia	Basal				ISO 100 nM				
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	
CPVT-51									
CPVT-52	7.42E-07				1.26E-05				
CPVT-53	1.25E-07	1			1	3.18E-16			
CPVT-54	4.24E-32	4.63E-16	1.87E-18		2.28E-24	3.79E-11	2.66E-46		
CPVT-55	1	0.0004	0.0002	7.20E-23	1	1.22E-10	1	3.99E-33	

## Annex

### 8. Resum de l'anàlisi comparatiu dels paràmetres analitzats en els transitoris induïts per cafeïna 10 mM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S

Taula S10. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren la mitjana±ES de tots els iPSC-CM analitzats.

Basal						
Línia	n	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
GPG1	613	700.70±11.19	176.10±3.89	533.08±8.53	884.99±13.18	2.36±0.03
CPVT-51	611	932.72±14.50	220.68±6.11	482.63±12.54	858.39±19.65	2.73±0.04
CPVT-52	481	819.03±10.18	186.80±5	488.17±11.12	883.76±12.08	2.83±0.05
CPVT-53	1187	752.54±8.59	138.51±2.49	602.14±8.78	965.62±9.95	2.90±0.05
CPVT-54	857	770.84±11.87	183.42±5.18	577.68±10.91	952.98±13.49	2.44±0.03
CPVT-55	705	811.19±8.67	172.71±4.12	521.71±6.02	918.14±7.47	2.55±0.04

Taula S11. Valors mitjans dels paràmetres quantificats dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en presència d'ISO 100nM dels iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S. Es mostren la mitjana±ES de tots els iPSC-CM analitzats.

ISO 100 nM						
Línia	n	Durada al 50% del transitori (ms)	Temps d'alliberació 10-90% (ms)	Temps de recaptació 50-10% (ms)	Temps de recaptació 90-10% (ms)	Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )
GPG1	632	649.96±9.29	129.76±2.02	613.95±7.54	967.37±8.61	2.80±0.04
CPVT-51	854	888.97±13.37	179.45±4.29	534.28±15.17	901.91±16.54	2.72±0.03
CPVT-52	781	758.60±13.54	131.46±2.63	538.11±8.24	924.59±9.79	2.91±0.03
CPVT-53	1365	792.97±8.66	140.65±2.10	534.21±8.98	909.19±10.08	2.85±0.02
CPVT-54	731	708.35±11.13	132.36±3.24	563.45±6.71	938.91±8.06	2.42±0.03
CPVT-55	735	746.82±8.34	134.34±2.59	517.44±7.96	912.41±8.51	2.97±0.04

## Annex

**Taula S12.** p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de la durada al 50% dels transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència de ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Durada al 50% del transitori (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	6.00E-09				3.13E-15			
CPVT-53	2.53E-32	0.0005			9.38E-11	0.2477		
CPVT-54	2.59E-23	0.0675	1		1.02E-27	0.0337	1.18E-07	
CPVT-55	2.64E-12	1	0.0005	0.1153	1.84E-17	1	0.0240	0.3173

**Taula S13.** p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA del temps d'alliberació 10-90% dels transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps d'alliberació 10-90% (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	4.06E-05				1.17E-28			
CPVT-53	3.73E-42	7.66E-13			3.00E-24	0.2382		
CPVT-54	4.40E-08	1	4.87E-16		1.08E-26	1	0.5000	
CPVT-55	3.88E-12	0.6601	1.94E-08	1	1.24E-24	1	1	1

**Taula S14.** p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de la durada del temps de recaptació 50-10% dels transitoris de  $Ca^{2+}$  induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps de recaptació 50-10% (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	1				1			
CPVT-53	2.16E-17	1.57E-13			1	1		
CPVT-54	6.61E-10	1.18E-07	0.6703		0.7341	1	0.4504	
CPVT-55	0.1397	0.5544	7.86E-09	7.76E-04	1	1	1	0.0412

## Annex

Taula S15. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de la durada del temps de recaptació 90-10% dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Temps de recaptació 90-10% (ms)								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	1				1			
CPVT-53	1.18E-08	0.0002			1	1		
CPVT-54	5.00E-06	0.0077	1		0.3834	1	0.7291	
CPVT-55	0.0299	1	0.0645	0.7500	1	1	1	1

Taula S16. p-valors de l'anàlisi comparatiu amb *One-Way* ANOVA de l'amplitud dels transitoris de Ca<sup>2+</sup> induïts per cafeïna 10 mM en condicions basals i en presència d'ISO 100 nM entre els iPSC-CM dels individus portadors de la mutació RYR2\_p.G357S en heterozigosis i homozigosis.

Amplitud del transitori ( $\Delta F/F_0$ )								
Línia	Basal				ISO 100 nM			
	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54	CPVT-51	CPVT-52	CPVT-53	CPVT-54
CPVT-51								
CPVT-52	1				0.0005			
CPVT-53	0.0029	1			0.0212	1		
CPVT-54	7.22E-08	3.20E-12	6.12E-27		4.13E-09	6.66E-23	3.99E-22	
CPVT-55	0.0102	8.11E-06	7.42E-14	0.2381	1.65E-06	1	0.0767	1.04E-27



## Annex

### 9. Posició genòmica de les variants i transcrit utilitzat per l'anotació de les variants

Taula S17. Localització genòmica de les variants i transcrit utilitzat per l'anotació de les variants trobades a l'individu CPVT-51 i les compartides entre els individus CPVT-52 i CPVT-53.

<b>Gen</b>	<b>Posició genòmica</b>	<b>Variante de Nucleòtid</b>	<b>Transcrit de referència</b>
<i>DSP</i>	7581032	c.C4609T	ENST00000379802
<i>MYH6</i>	23876267	c.G166A	ENST00000405093
<i>SCN11A</i>	38888195	c.A5366G	ENST00000302328
<i>TTN</i>	179474488	c.G51662A	ENST00000589042
<i>AKAP9</i>	91708898	c.A7451G	ENST00000356239
<i>CACNA1H</i>	1252441	c.T1991C	ENST00000348261
<i>CACNB2</i>	18828635	c.T1965G	ENST00000324631
<i>DPP6</i>	154379646	c.C914T	ENST00000406326
<i>NEBL</i>	21157673	c.G604A	ENST00000377122
<i>PITX2</i>	111542124	c.C607T	ENST00000557119
<i>PITX2</i>	111542154	c.C577T	ENST00000557119
<i>SCN10A</i>	38766760	c.C3133A	ENST00000449082
<i>TP63</i>	189349247	c.A-58T	ENST00000264731
<i>XIRP1</i>	39226114	c.C4823T	ENST00000340369
<i>XIRP2</i>	168115325	c.A1603G	ENST00000409605